



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Caracterización del mecanismo de acción de la helicasa
replicativa G40P y su cargador G39P en la replicación del
bacteriófago SPP1 de *Bacillus subtilis*.

Tesis Doctoral

Pablo Mesa García

Madrid, Abril de 2014

Centro Nacional de Biotecnología



Memoria presentada por **Pablo Mesa García**, Licenciado en Ciencias Biológicas, para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Biotecnología Microbiana del **Centro Nacional de Biotecnología** (CNB, CSIC) bajo la dirección del **Dr. Juan Carlos Alonso Navarro**. Para su realización se contó con una beca del Programa de Formación de Personal Investigador (FP1) de la Comunidad de Madrid y el Fondo Social Europeo.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a Juan C. Alonso la oportunidad de trabajar en su grupo. Gracias por toda la formación y ayuda recibida. Gracias también por su paciencia a lo largo de todos estos años. Agradezco también su ayuda a Silvia Ayora, con quién empecé a trabajar en el laboratorio, y al resto de personas que formaron parte del grupo durante el tiempo en el que permanecí en el CNB, especialmente a Candela Manfredi, Begoña Carrasco, Casti Cozar y María Martínez.

Gracias a mi familia por todo su apoyo y comprensión.

A mis padres.

Índice

Índice	i
Índice de figuras	v
Abreviaturas	ix
Summary	xi
1. Introducción	1
1.1 La helicasa DnaB.	3
1.2 Helicasas hexaméricas y el replisoma.	4
1.3 Caracterización bioquímica y estructural de las helicasas hexaméricas.	7
1.4 Formación del complejo DnaB·DnaC y el origen de replicación.	9
1.5 Liberación de DnaC desde el complejo DnaB·DnaC	10
1.6 Inicio de la replicación del bacteriófago SPP1.	13
1.7 Helicasas como dianas de inhibidores.	15
2. Objetivos	19
3. Materiales y Métodos	23
3.1 Enzimas y reactivos.	25
3.2 Oligonucleotidos y sustratos ADN de reacción.	25
3.3 Marcaje de oligos.	26
3.4 Soluciones empleadas.	26
3.5 Producción de proteínas.	26
3.6 Cromatografía por exclusión de tamaño.	27
3.7 Ensayos EMSA.	27
3.8 Ensayos de unión a doble filtro.	28
3.9 Ensayos ATPasa.	28
3.10 Ensayos de protección de ADN.	29
3.11 Ensayos de actividad helicasa.	29

3.12 Ensayos de hibridación de cadenas.	30
3.13 Ensayos de inhibición de la actividad de G40P.	31
3.14 Ensayos de retención en resina de níquel.	32
3.15 Ensayos de proteólisis controlada.	32
3.16 Entrecruzamiento químico de proteínas.	32
3.17 Entrecruzamiento por irradiación con luz UV de ADNcs y proteína.	33
3.18 Ensayos FRET.	34
4. Resultados	35
4.1 Purificación de G40P.	37
4.2 Caracterización inicial de G40P.	38
4.3 Variantes de delección de G40P.	39
4.4 Caracterización comparativa de G40PΔN109.	40
4.4.1 Estabilidad de G40PΔN109.	40
4.4.2 Unión a ADNcs.	41
4.4.3 Actividad ATPasa.	43
4.4.4 Ensayos de protección de ADN.	44
4.4.5 Actividad Helicasa en distintos sustratos.	47
4.4.6 Estudio estructural por microscopía electrónica de G40PΔN109 y G40P.	53
4.5 Efecto de G39P en la actividad helicasa de G40P.	55
4.5.1 Efecto de G39P en la actividad helicasa de G40P y G40PΔN109.	55
4.5.2 Efecto de G39P sobre el cargado de G40P en ADNcd.	56
4.6 Apareamiento de cadenas complementarias de ADN y G40PΔN109.	59
4.6.1 G40PΔN109 promueve la hibridación de cadenas de ADN.	59
4.6.2 Inhibición de la actividad de hibridación de G40PΔN109.	59
4.6.3 Comparación entre las actividades de RecA y G40PΔN109.	60
4.6.4 Comparación de la actividad de hibridación de G40PΔN109 y G40P.	61
4.6.5 Dependencia del pH de la actividad de hibridación de G40PΔN109.	62
4.6.6 G40PΔN109 puede alojar dos cadenas de ADN en su canal central.	64
4.7 Estudio del papel de G39P en el cargado de G40P.	66
4.7.1 Estructura de G39P.	66
4.7.2 Interacción de G40P con G39P.	68
4.7.3 Susceptibilidad de G39P a degradación proteolítica.	70
4.7.4 Protección de G39P frente a degradación.	72
4.7.5 Estado oligomérico de G39P.	75

4.7.6 Entrecruzamiento con luz ultravioleta de G39P y ADNcs.	77
4.7.7 Estudio de la interacción entre G39P y G40P mediante ensayos FRET.	81
4.7.8 Validación inicial del sistema FRET hCFP39-hYFP39.	83
4.7.9 G40P promueve el efecto de FRET entre hCFP39 y hYFP39.	85
4.7.10 La importancia del ATP en el efecto FRET promovido por G40P.	87
4.7.11 Alteración de la unión entre G40P y G39P en ensayos FRET.	90
4.8 Inhibidores de G40P.	92
4.8.1 Inhibición de la actividad ATPasa de G40P.	92
4.8.2 Efecto de la griseorrodina C en la cinética de la actividad helicasa de G40P.	93
4.8.3 Disminución de la inhibición en presencia de ADNcs.	94
4.8.4 Inhibición de la actividad helicasa de G40P.	95
5. Discusión	97
5.1 Papel del dominio amino terminal de G40P.	99
5.2 La polaridad de la actividad helicasa de G40PΔN109.	104
5.3 La actividad de apareamiento de cadenas de G40PΔN109.	110
5.4 Modelo de acción de G39P en el cargado de G40P sobre ADNcs.	113
5.5 Acción de G39P en el cargado de G40P sobre ADNcd.	118
5.6 Herramienta FRET.	119
5.7 Inhibición de la actividad de G40P por griseorrodina C.	119
6. Conclusiones	125
7. Bibliografía	129
8. Anexo	145

Índice de figuras

Figura 1. Primeros ensayos helicasa realizados con la proteína DnaB.....	3
Figura 2. Proteínas constituyentes y organización del replisoma de <i>E.coli</i>	5
Figura 3. Tipos de helicasas hexaméricas replicativas.....	6
Figura 4. Pirámide de las actividades de una helicasa hexamérica replicativa.....	7
Figura 5. Flexibilidad conformacional de DnaB (microscopía electrónica).....	8
Figura 6. Estructura del dominio helicasa de T7gp4.....	9
Figura 7. Modelos del mecanismo de liberación de DnaC desde el complejo DnaB·DnaC.....	11
Figura 8. Transiciones estructurales del complejo DnaB·DnaC.....	12
Figura 9. Replicación del fago SPP1.....	14
Figura 10. Estructuras químicas de los compuestos empleados como inhibidores de G40P.....	16
Figura 11. Expresión y purificación del complejo h39-G40P.....	37
Figura 12. Caracterización de la inhibición por sustrato de la actividad ATPasa de G40P.....	38
Figura 13. Modelo estructural de G40P.....	39
Figura 14. Estabilidad de G40PΔN109 en experimentos de cromatografía de filtración en gel.....	40
Figura 15. Análisis de la unión de G40PΔN109 a ADNcs en ensayo de retardo en gel.....	41
Figura 16. Unión a ADNcs de G40P y G40PΔN109 determinada por ensayos de doble filtro.....	42
Figura 17. Actividad ATPasa dependiente de ADNcs de G40P y G40PΔN109.....	43
Figura 18. Inhibición por sustrato en la actividad ATPasa de G40P y G40PDN109.....	43
Figura 19. Ensayos de protección de ADNcs con ExoVII.....	44
Figura 20. Ensayos de protección de ADNcd con ExoVI y ExoIII.....	45
Figura 21. Sustratos empleados para el estudio de la actividad helicasa.....	47
Figura 22. Geles de actividad helicasa.....	48
Figura 23. Actividad helicasa de G40P y G40PΔN109 a pH 7,0.....	49
Figura 24. Actividad helicasa de G40P y G40PΔN109 a pH 6,5.....	50
Figura 25. Efecto del pH en la actividad helicasa de G40P y G40PΔN109.....	51
Figura 26. Actividad helicasa a distintas concentraciones de G40P y G40PDN109.....	52
Figura 27. Inhibición de la actividad helicasa a altas concentraciones de ATP.....	52
Figura 28. Polimorfismo cuaternario de G40P y G40PΔN109.....	54
Figura 29. Efecto de G39P sobre la actividad helicasa de G40P y su mutante de delección.....	55
Figura 30. Efecto de G39P sobre el cargado de G40P en ADNcd.....	57
Figura 31. G39P inhibe la actividad helicasa de G40P derivada de la unión a ADNcd.....	58
Figura 32. G40PΔN109 acelera la hibridación de cadenas de ADN complementarias.....	59

Figura 33. Efecto del ATP y G39P sobre la hibridación producida por G40PAN109.....	60
Figura 34. Comparación de las actividades de RecA y G40PAN109.	61
Figura 35. Comparación de las actividades de G40P y G40PAN109.....	62
Figura 36. Hibridación y actividad helicasa de G40PAN109 según el pH.....	63
Figura 37. Actividad de hibridación de G40PAN109 a distintos valores de pH en ausencia de ATP.	63
Figura 38. G40P y G40PAN109 son capaces de englobar dos cadenas de ADN en su canal central.	64
Figura 39. Estructura de G39P.	67
Figura 40. Predicción de orden/desorden de G39P.....	68
Figura 41. Interacción de G40P con G39P.	69
Figura 42. Inhibición de la actividad ATPasa de G40P por h39 y hΔ39N73.	70
Figura 43. Proteólisis parcial de G39P.....	71
Figura 44. G40P protege a G39P frente a la degradación por Proteinasa K.....	73
Figura 45. Protección de G39P frente a la degradación por Proteinasa K.....	74
Figura 46. Entrecruzamiento químico de G40P.....	75
Figura 47. Entrecruzamiento de G39P.....	75
Figura 48. Entrecruzamiento con glutaraldehído de h39.....	76
Figura 49. Entrecruzamiento de ADNcs con G39P, inducido por radiación UV.	77
Figura 50. Entrecruzamiento UV de distintas proteínas con ADNcs.....	78
Figura 51. Interacción con ADNcs de G39P y G40P.....	78
Figura 52. Entrecruzamiento de G39P con ADNcs en presencia de distintos nucleótidos.....	79
Figura 53. Entrecruzamiento de ADNcs con versiones de delección de G39P.....	80
Figura 54. Ensayo FRET de interacción entre G39P y G40P.....	81
Figura 55. Interacciones de las fusiones de G39P-CFP/YFP con G40P.	82
Figura 56. FRET del par hCFP39-hYFP39 en ausencia de G40P.....	83
Figura 57. Asociación de hCFP39 y hYFP39 en presencia de Zn ²⁺	84
Figura 58. Efecto FRET en presencia de G40P.....	85
Figura 59. Efecto de la concentración de NaCl y MgCl ₂ sobre el efecto FRET.	86
Figura 60. Competencia con G39P en ensayos FRET.....	86
Figura 61. Interacción de G40PAN109 con hCFP39-hYFP39.....	87
Figura 62. Influencia del ATP en los ensayos FRET.	88
Figura 63. Interacción de hCFP39 con G40P en presencia de nucleótidos.	89
Figura 64. Interacción de h39 con G40P en presencia de nucleótidos.....	89
Figura 65. Retención de G40P frente a la concentración de ATP.....	90
Figura 66. Efecto de la adición de ADNcs en la señal de FRET.	90
Figura 67. Ruptura del complejo hCFP39-hYFP39-G40P por acción de hDnaG y G38P.....	91
Figura 68. Efecto de distintas drogas en la actividad ATPasa de G40P.	92
Figura 69. Cinética de la actividad ATPasa de G40P en presencia de griseorrodina C.....	93
Figura 70. Inhibición en presencia de ADNcs de la actividad ATPasa de G40P.	94

Figura 71. Efecto de las distintas drogas en la actividad helicasa de G40P.	95
Figura 72. Modelos estructurales de las construcciones G40PΔN109 y G40PΔN175.	100
Figura 73. Las actividades de distintos mutantes de delección de helicasas tipo DnaB.	103
Figura 74. Modelo del desplazamiento sobre ADNcs de G40P y G40PΔN109.	106
Figura 75. Mecanismos propuestos para la hibridación de ADN por mediación de G40PΔN109..	111
Figura 76. Modelo del proceso de cargado de G40P en ADNcs mediado por G39P.....	115
Figura 77. Relación entre la capacidad de inhibición y la estructura química de las drogas analizadas.	120
Figura 78. Comparación del efecto inhibitorio de distintas moléculas en la actividad de G40P....	122

Abreviaturas

(p/v)	peso por volumen
(v/v)	volumen por volumen
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNcd	ácido desoxirribonucleico de cadena doble.
ADNcs	ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla.
ADP	difosfato de adenosina.
ASB	albúmina de suero bovino.
ATP	trifosfato de adenosina.
CFP	proteína de fluorescencia cian.
DCT	dominio carboxilo terminal.
DMSO	dimetil sulfóxido.
DNT	dominio amino terminal.
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético.
GFP	proteína de fluorescencia verde.
ME	microscopía electrónica.
min	minutos.
nt	nucleótido.
NTP	nucleótido trifosfato.
pb	pares de bases.
PEI	polietilénimina.
Pi	fosfato inorgánico.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
s	segundo.
SDS	Dodecil sulfato sódico.
t	tiempo.
TBE	Tris borato EDTA.
U	unidad enzimática.
ua	unidades arbitrarias.
UV	ultravioleta.
v0	velocidad inicial (actividad ATPasa).
YFP	proteína de fluorescencia amarilla.

Summary

The *Bacillus subtilis* SPP1-encoded G40P is a hexameric replicative helicase that unwinds dsDNA with a 5'→3' polarity. During the amplification of the SPP1 genome this DnaB-like helicase uses its ATP-powered motor activity to provide ssDNA to the host polymerases, the DnaG primase and the DNA polymerases (polC and DnaE). G40P is also involved in the initiation of SPP1 DNA replication, with two other phage-encoded proteins: G39P and G38P. Through its interactions with G40P and G38P, G39P is able to load the helicase into the replication origin (*oriL*), which is recognized and locally unwound by G38P. This system represents an alternative mechanism to the reference model exemplified by *Escherichia coli* DNA replication initiation proteins: DnaA, DnaC and DnaB.

This work addresses the study of G40P helicase activity and the role of G39P in the helicase loading mechanism. Different deletion constructs were used in order to link functions to structural features of these two proteins. In this regard, a G40P mutant lacking the N-terminal domain, G40PΔN109, showed two unexpected activities. It was able to unwind DNA bidirectionally, with an additional 3'→5' translocation activity which is absent in wild-type G40P. Surprisingly, G40PΔN109 was also capable of anneal complementary DNA strands. In order to explain these activities, we propose a regulatory function for the N-terminal domain of G40P. This part of the helicase could be involved in the control of the relative disposition of the ATPase C-terminal domains and in the regulation of the DNA-binding activity. Structural and biochemical studies showed that G39P contains two different domains, a folded N-terminal domain and a natively disordered C-terminal domain. We propose that this bimodular structure is essential for G39P to function as a helicase loader. The interaction of the disordered regions with G40P would induce the association of the N-terminal domains of G39P, and this event could force the opening of the helicase ring. Then G40P is loaded on the DNA and G39P is released. By using this mechanism G39P promotes the loading of G40P on ssDNA and prevents the loading on dsDNA.

In addition, small natural compounds griseorhodin C and purpuromyacin were found to inhibit the ATPase and helicase activities of G40P.

1. Introducción

1.1 La helicasa DnaB.

En 1986 LeBowitz y McMacken determinaron que la proteína DnaB de *Escherichia coli* presentaba actividad helicasa de ADN, siendo capaz de desenlazar y separar las dos hebras sencillas que constituyen una cadena de ADN (LeBowitz y McMacken, 1986; Figura 1). Un paso considerable si se tiene en cuenta que con anterioridad ‘únicamente’ se sabía que era una proteína implicada en el avance de la síntesis del ADN, en las denominadas horquillas de replicación. DnaB dejaba así de ser la mera expresión de un gen implicado en una determinada función, la replicación del material genético de la bacteria. Se pasaba por tanto de un conocimiento basado en el más puro análisis genético a algo mucho más tangible, a una

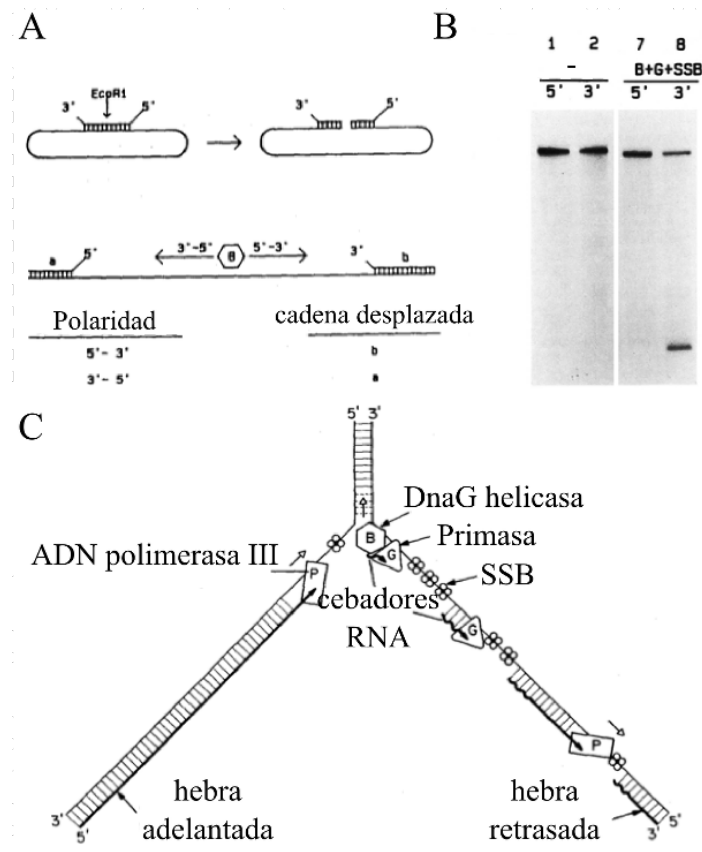


Figura 1. Primeros ensayos helicasa realizados con la proteína DnaB.

A) Diseño de los sustratos empleados en el artículo original. **B)** Ensayo helicasa de separación de la cadena marcada con radiactividad (banda inferior) desde los sustratos iniciales (bandas superiores). El símbolo (-) representa la ausencia de proteína; B+G*SSB indica que las reacciones contenían DnaB, DnaG y SSB. **C)** Esquema del papel propuesto para la helicasa DnaB y otras proteínas en el progreso de una horquilla de replicación de *E. coli* (LeBowitz y McMacken, 1986).

actividad específica e inequívoca con la que se podía experimentar en un tubo de ensayo, para tratar de emular y desentrañar aquello que ocurría en el interior de la célula (Baker, Funnell y Kornberg, 1987). Previamente ya se había asignado actividad ATPasa a DnaB (Wickner, Wright y Hurwitz, 1974), pero ahora con la asignación de actividad helicasa su papel en el proceso de la replicación del ADN empezaba a quedar más claro (Figura 1 C).

El trabajo realizado en la presente memoria se centra en la proteína G40P del bacteriófago SPP1 que infecta a la bacteria *Bacillus subtilis* (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999). Esta proteína es también una helicasa que pertenece a la familia de DnaB y que está implicada en el proceso de la replicación del fago SPP1. De hecho, el sistema de replicación de *E. coli*, en ciertos aspectos que se mostrarán más adelante, es muy parecido al sistema centrado en la proteína G40P.

1.2 Helicasas hexaméricas y el replisoma.

Las helicasas hexaméricas implicadas en el proceso de replicación del ADN genómico de organismos procariontes pueden considerarse motores a escala molecular que de manera transitoria abren la cadena doble de ADN con el fin de proporcionar los sustratos últimos que sirven de molde para la síntesis de nuevo ADN, secciones expuestas de ADN de cadena sencilla (Figura 1 C; Patel y Picha, 2000). Dada la importancia de la función de síntesis, en cuanto a proliferación celular y evolución, este es un proceso que se haya estricta y cuidadosamente regulado en el espacio y en el tiempo dentro de cada célula, no solo porque debe estar acoplado perfectamente al resto de procesos que constituyen el ciclo celular sino porque la exposición del ADNcs hace que este sea muy vulnerable a procesos de degradación y recombinación. Con el fin de cumplir todos los requerimientos necesarios, la evolución y la organización celular han recurrido a una estrategia bastante extendida en la funcionalidad de las células, la asociación de distintas proteínas en intrincados complejos. Este es el caso del replisoma, un conjunto de proteínas en el que las interacciones (transitorias o mantenidas en el tiempo) entre ellas, el ADNcd y el ADNcs dictan el comportamiento del complejo (Figura 2). Se trata pues de una superposición de funciones y papeles estructurales que culminan en la duplicación completa del material genético del organismo (Schaeffer, Headlam y Dixon, 2005; Liu, Lin y Steitz, 2013). Dentro de este conjunto de proteínas las helicasas hexaméricas se encargan de suministrar ADN de cadena sencilla, rompiendo los puentes de hidrógeno que mantienen la forma estable del ADN de cadena doble (von Hippel y Delagoutte, 2001). También contribuyen al movimiento unidireccional de todo el replisoma a lo largo del ADN que está siendo replicado (Patel, Pandey y Nandakumar, 2011). Finalmente, proporcionan unos cimientos estructurales que permiten la asociación con otras proteínas, como es el caso de la vinculación de la primasa y la DNA

polimerasa dado que DnaB está ligada con ambas. Resulta por tanto muy importante que las distintas actividades presentes en el replisoma se coordinen y ejecuten de manera eficiente, haciendo que este sea uno de los complejos mas interesantes, elaborados y a la vez difícil de estudiar, pues la magnitud de la complejidad de la sincronización de las distintas acciones está a la par que la importancia de su función conjunta. Realmente aunque la interacción con la primasa es directa, el contacto con la DNA polimerasa se lleva a cabo a través del cargador de la abrazadera deslizante (Figura 2; Kelch *et al.*, 2012). Este contribuye también a mantener la integridad del complejo al unir la helicasa con varias copias de la DNA polimerasa, que se encargan de la síntesis de ADN, a partir de los cebadores de RNA generados por la primasa (Johnson y O'Donnell, 2005). También se encarga del cargado de las abrazaderas deslizantes, que rodean al ADN e interaccionan con las ADN polimerasas para conferirles mayor procesividad y velocidad. Mientras, la porción de ADN que queda expuesta en forma de cadena sencilla es protegida por multitud de tetrámeros de la proteína SSB. Observando toda esta complejidad resulta sorprendente como la naturaleza ha conseguido aunar todas estas actividades y hacer que se desarrollen de manera simultánea con una gran eficiencia.

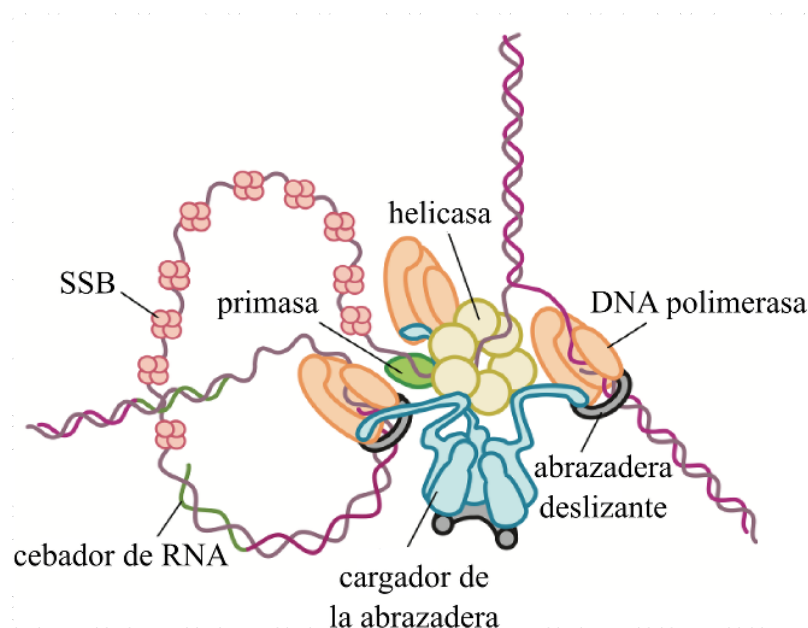


Figura 2. Proteínas constituyentes y organización del replisoma de *E.coli*.

Esquema de la distribución de las proteína que constituyen el replisoma en una horquilla de replicación. Se muestran las interacciones que tienen lugar entre los distintos componentes del replisoma (Kelch *et al.*, 2012). Comparar con la visión más antigua de la figura 1 C.

Introducción

Nos centraremos aquí únicamente en el sistema de replicación de los organismos procariontes, puesto que es el empleado por el fago SPP1, si bien para los organismos eucariontes se ha desarrollado una solución que en líneas generales es similar (Méndez y Stillman, 2003; Li y Araki, 2013). Sin embargo existen diferencias claras tanto en la organización como en las propias proteínas implicadas, de manera que incluso se ha propuesto que el sistema de replicación evolucionó de manera independientemente en bacterias y en eucariontes/arqueas (Leipe, Aravind y Koonin, 1999; Giraldo, 2003). Una de las principales diferencias, que resulta relevante para lo que más tarde se expondrá en la parte experimental de esta memoria, es que las helicasas hexaméricas de estos linajes pertenecen a distintas familias (Li y Araki, 2013). Así, las helicasas tipo DnaB son homólogos estructurales de la proteína RecA (Thomsen y Berger, 2008) y cuando avanzan sobre ADNcs al desarrollar su actividad helicasa presentan una polaridad $5' \rightarrow 3'$. Sin embargo, los complejos Cdc45·MCM·Gins (CMG) de arqueas y organismos eucariontes, que pertenecen al grupo AAA+ (Erzberger y Berger, 2006), presentan una polaridad $3' \rightarrow 5'$ (Brewster y Chen, 2010). Partiendo de un mismo núcleo estructural, un dominio ATPasa ancestral, se han desarrollado dos soluciones distintas que presentan rasgos comunes y que permiten resolver la tarea de la replicación, pero lo hacen mediante mecanismos diferentes.

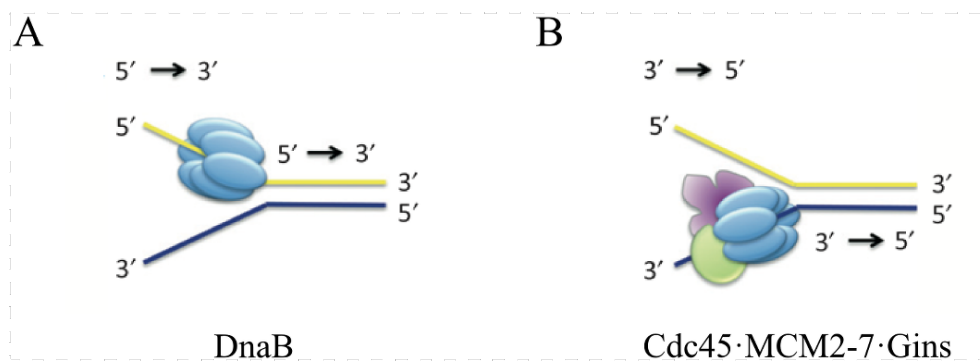


Figura 3. Tipos de helicasas hexaméricas replicativas.

Se muestra esquemáticamente la polaridad que exhiben las dos clases de helicasa sobre un sustrato con forma de horquilla de replicación. **A)** Helicasa tipo DnaB con polaridad $5' \rightarrow 3'$. **B)** Complejo CMG con polaridad $3' \rightarrow 5'$ (Li y Araki, 2013).

En este sentido, cabe preguntarse si la línea trazada que diferencia las polaridades de los dos tipo de helicasa es una barrera infranqueable, lo que supondría que cada grupo ha desarrollado una manera de operar interna distintiva, o si hay alguna manera de hacer que una helicasa cambie el tipo de polaridad que puede desarrollar.

1.3 Caracterización bioquímica y estructural de las helicasas hexaméricas.

Gran parte del trabajo de caracterización de este tipo de proteínas se ha desarrollado centrándose en la proteína DnaB de *E.coli* y en la primasa-helicasa del fago T7, aunque no exclusivamente (Patel y Picha, 2000; Lee y Richardson, 2011). Estudios de comparación de secuencias, centrados en la comparación del dominio ATPasa, vincularon a las helicasas hexaméricas tipo DnaB con RecA (Gorbalenya y Koonin, 1993; Leipe *et al.*, 2000) y a lo largo del tiempo diversos trabajos estructurales han confirmado esta conexión (Yu y Egelman, 1997; Bird, Subramanya y Wigley, 1998; Sawaya *et al.*, 1999; Singleton *et al.*, 2000). En paralelo, la caracterización bioquímica de las actividades de estas proteínas fue revelando aspectos importantes de su funcionamiento: como el hecho de que el ADNcs al que se unen pasa por el interior del canal central del hexámero (Yu *et al.*, 1996a; Jezewska *et al.*, 1998), la caracterización del proceso de cargado no asistido (Ahnert, Picha y Patel, 2000; Picha, Ahnert y Patel, 2000), la organización en dominios diferenciados (Nakayama *et al.*, 1984b) o el estado en el que se encuentran los sitios de unión e hidrólisis de NTP y como afectan a la proteína (Bujalowski y Klonowska, 1993; Rajendran, Jezewska y Bujalowski, 2000). El conjunto de estos resultados fue dando lugar a una imagen en la que la actividad helicasa es el resultado de la conjunción de otras actividades subyacentes (Lohman y Bjornson, 1996; Patel y Picha, 2000; Singleton, Dillingham y Wigley, 2007), existiendo un alto grado de interdependencia y jerarquización entre ellas (Figura 4).

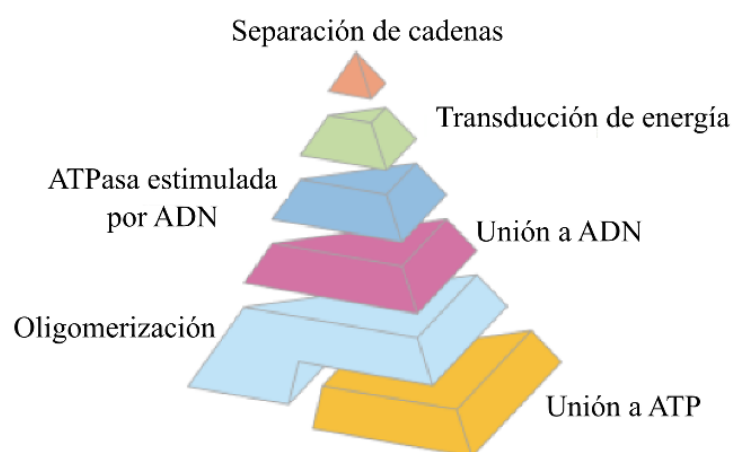


Figura 4. Pirámide de las actividades de una helicasa hexamérica replicativa.

La actividad helicasa, en la cúspide de la pirámide, se sustenta en el resto de las actividades de la proteína, estando todo el conjunto interconectado (Patel y Picha, 2000).

Introducción

Los primeros datos estructurales sobre estas helicasas replicativas hexaméricas fueron obtenidos mediante el uso de técnicas de microscopía electrónica, tanto análisis de imágenes 2D promedio (Yu *et al.*, 1996b; Yu y Egelman, 1997; Bárcena *et al.*, 1998; Donate *et al.*, 2000) como reconstrucciones 3D (Yang *et al.*, 2002). Así, secuencialmente se fue determinando que la proteína era un hexámero y que cada subunidad presentaba dos dominios, el dominio helicasa (carboxi terminal, ATPasa) y el dominio amino terminal, mostrando el conjunto del anillo una gran flexibilidad conformacional (Yang *et al.*, 2002). Sobre este último aspecto se comentará más en el apartado de resultados y en la discusión de esta memoria (Figura 28).

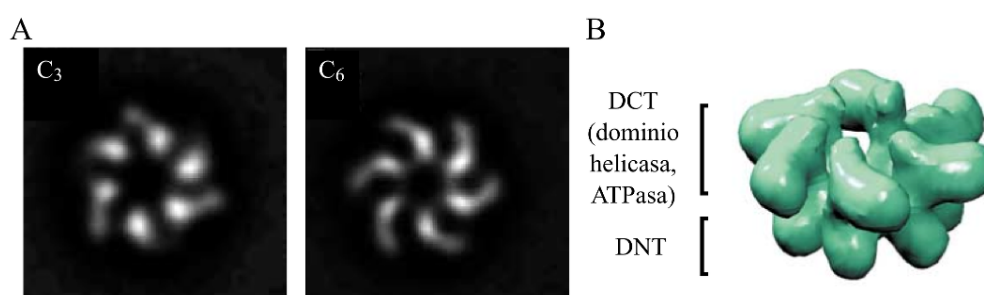


Figura 5. Flexibilidad conformacional de DnaB (microscopía electrónica).

A) Polimorfismo cuaternario (partículas con simetría C₃ o C₆) en imágenes promedio 2D. B) Reconstrucción 3D de la helicasa DnaB. Se muestran los dominios amino terminal y carboxi terminal (DNT y DCT respectivamente).

Al igual que en el resto de helicasas la funcionalidad de las del tipo DnaB gira en torno al dominio ATPasa (Singleton, Dillingham y Wigley, 2007). La resolución de la estructura del mutante de delección T7gp4D de la primasa-helicasa del fago T7, que carece del dominio primasa, proporcionó una gran cantidad de información referida al mecanismo de acción de las helicasas hexaméricas (Singleton *et al.*, 2000). Según esta estructura, dentro del hexámero la orientación relativa de las distintas subunidades viene dada por la presencia o ausencia de ATP, así como por el estado de hidrólisis de este. De esta manera, al igual que pasa con helicasas de otras familias, algunas de las cuales son de tipo monomérico o dimérico (Singleton, Dillingham y Wigley, 2007), la capacidad de desplazamiento sobre el ADNcs viene dictada por el movimiento relativo de unas subunidades con respecto a otras. En algunos casos estos movimientos no se dan entre subunidades sino entre dominios de una misma subunidad (Soultanas y Wigley, 2000; Singleton, Dillingham y Wigley, 2007). En el caso de las helicasas hexaméricas al encontrarse los bucles de unión a ADN en el orificio central del hexámero y al estar dispuestos en forma de hélice, el comentado movimiento de rotación relativo desplaza los

bucles de unión a ADN a largo del eje del orificio. De esta manera, se propuso que los ciclos de hidrólisis de ATP promueven el desplazamiento de la helicasa sobre el ADN de cadena sencilla (Singleton *et al.*, 2000).

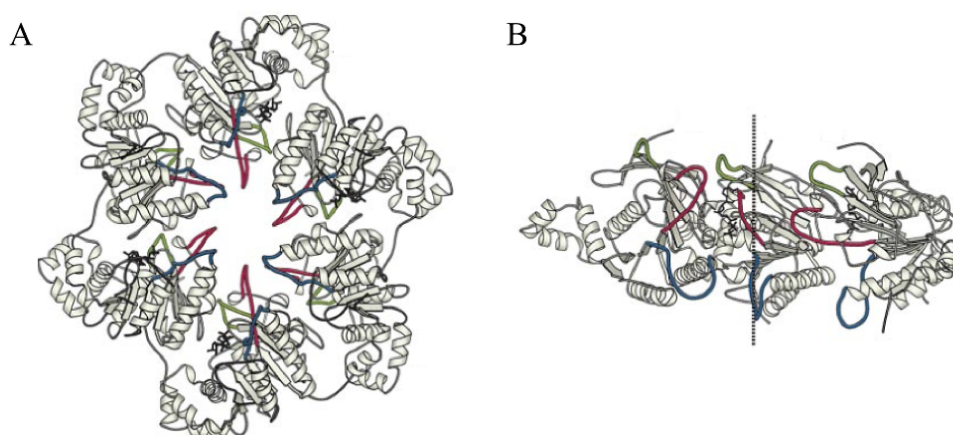


Figura 6. Estructura del dominio helicasa de T7gp4.

A) Disposición de las subunidades que forman el hexámero de la helicasa. **B)** Vista lateral en la que se observa la orientación de los bucles internos en forma de espiral, conseguida mediante la rotación relativa de las distintas subunidades. Por claridad únicamente se muestran tres subunidades; la línea vertical de puntos pasaría por el orificio central de la helicasa (Singleton *et al.*, 2000).

Posteriormente a la realización de la parte experimental de esta memoria se publicaron diferentes estructuras de helicasas hexaméricas con y sin ADNcs, por lo que el mecanismo propuesto anteriormente se comprobó que era válido y se profundizó en su comprensión (Bailey, Eliason y Steitz, 2007; Enemark y Joshua-Tor, 2006; Enemark y Joshua-Tor, 2008; Thomsen y Berger, 2009; Lyubimov, Strycharska y Berger, 2011; Itsathitphaisarn *et al.*, 2012). Sobre todas estas estructuras se hablará a lo largo de la discusión de esta memoria.

1.4 Formación del complejo DnaB·DnaC y el origen de replicación.

Tan importante como la propia síntesis de ADN es la activación del origen de replicación, una secuencia específica del ADN a partir de la cual se inicia el proceso de replicación (Zakrzewska-Czerwińska *et al.*, 2007; Mott y Berger, 2007; Gai, Chang y Chen, 2010; Costa, Hood y Berger, 2013). Las helicasas replicativas del tipo DnaB precisan interaccionar con las denominadas proteínas cargadoras para poder llevar a cabo su función en el origen de replicación. Sin embargo, estas helicasas son capaces de unirse a ADN por sí solas,

sin necesitar la ayuda de un cargador (Bujalowski y Jezewska, 1995; Jezewska, Kim y Bujalowski, 1996; Jezewska *et al.*, 1998), por lo que se plantea la duda de cuál es entonces el papel de dichos cargadores. La evidencia experimental ha ido mostrando que el cargador de DnaB, DnaC, es capaz de reconocer complejos proteína-ADN específicos, en este caso los complejos DnaA-[origen de replicación] (Marszalek y Kaguni, 1994). Así la interacción entre DnaA y DnaC permite la localización concreta de la helicasa replicativa DnaB (Mott *et al.*, 2008). En el caso de *E.coli*, DnaA se une específicamente a las llamadas cajas-DnaA, secuencias de 9 pares de bases que no constituyen palíndromos, de tal manera que su oligomerización en presencia de ATP permite la extensión del complejo a zonas de ADN contiguas, lo que finalmente promueve la apertura del ADN en zonas adyacentes ricas en bases AT (Bramhill y Kornberg, 1988; Erzberger, Mott y Berger, 2006; Duderstadt, Chuang y Berger, 2011). Este mecanismo de localización del origen de replicación se encuentra meticulosamente regulado de manera que solamente se produce una vez por ciclo, únicamente en el lugar destinado a ello (*oriC*) y en el momento preciso (Zakrzewska-Czerwińska *et al.*, 2007; Mott y Berger, 2007; Leonard y Grimwade, 2011; Skarstad y Katayama, 2013). Si bien todos los organismos y virus cumplen con un mismo objetivo, el inicio localizado de la replicación, la forma en que consiguen esto es a través de métodos bastante distintos, mostrando aquí mayor variabilidad frente al consenso alcanzado con el uso del replisoma (Weigel y Seitz, 2006; Gai, Chang y Chen, 2010; Soultanas, 2012) (Li y Araki, 2013).

1.5 Liberación de DnaC desde el complejo DnaB·DnaC

Una vez que se ha formado el complejo DnaB·DnaC y este pasa a interactuar con el ADN de cadena sencilla se precisa que DnaC salga del complejo, puesto que inhibe las actividades de DnaB y se necesita una helicasa funcional para poder iniciar el proceso de replicación. Para este paso, a lo largo de los años, se han llegado a proponer hasta tres mecanismos distintos que lo más probable es que no sean totalmente excluyentes, sino que simplemente se centran en distintos aspectos de un proceso que parece estar regido por numerosas variables (Figura 7).

El más antiguo de los modelos (Davey *et al.*, 2002) tiene en cuenta la débil actividad ATPasa de DnaC, que presenta los motivos típicos de la familia AAA⁺, y que sería estimulada por la unión de DnaB y ADNs. Con este modelo se propuso que DnaC funcionaba como un conmutador ATP-ADP (Figura 7 A). Esto supone que cuando está unida a ATP es capaz de interactuar con DnaB, inhibiendo la actividad de esta última, y promover el cargado del complejo en el origen de replicación (*oriC*). Sin embargo, cuando une ADP deja de inhibir las

actividades helicasa y ATPasa de DnaB, por lo que se consideró que mediante la hidrólisis del nucleótido que contiene se libera de la helicasa.

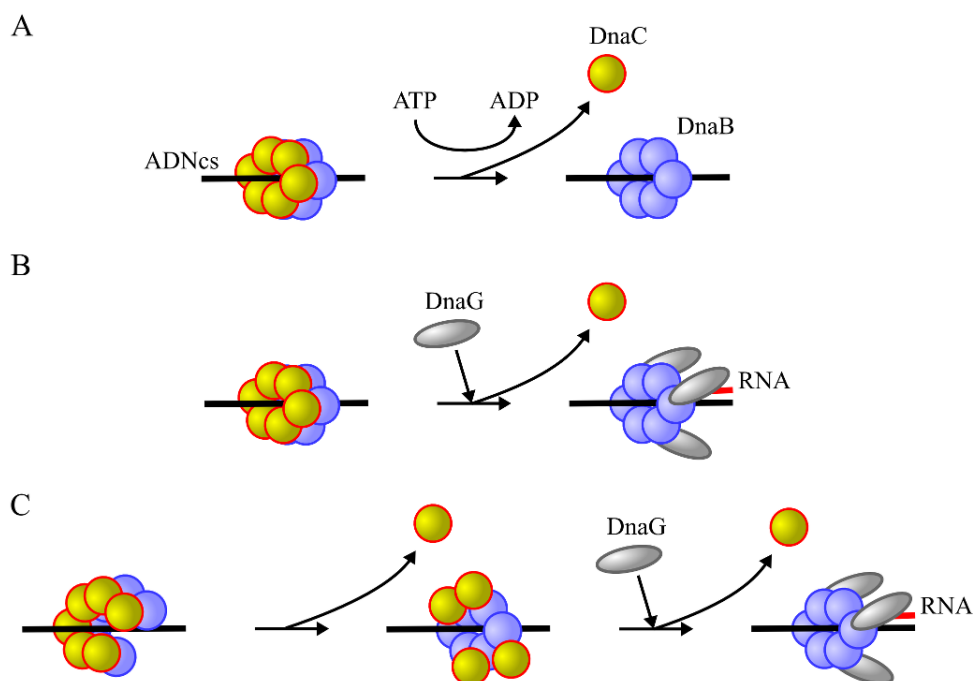


Figura 7. Modelos del mecanismo de liberación de DnaC desde el complejo DnaB·DnaC.

A) DnaC dirige su liberación al comportarse como un conmutador ATP-ADP. **B)** La unión de DnaG a DnaB y su actividad sintetizando segmentos de ARN promueve la salida de DnaC. **C)** Las transiciones conformacionales del anillo doble del complejo DnaB·DnaC promueven una primera liberación de DnaC, que se culmina con la unión de DnaG.

Más recientemente se ha planteado que la primasa DnaG es capaz de desplazar a DnaC, siempre y cuando se cumplan dos requisitos. El primero es que DnaG tiene que interactuar con el complejo DnaB·DnaC unido al ADN y el segundo consiste en que debe empezar a sintetizar los cebadores de ARN necesarios para la acción de la ADN polimerasa (Makowska-Grzyska y Kaguni, 2010) (Figura 7 B). Por lo tanto la salida de DnaC se produce en la transición existente entre las etapas de iniciación y elongación del proceso de replicación.

Sin embargo diversos trabajos presentan resultados que no encajan totalmente con estos dos modelos previos. Así, se ha visto que no se precisa la hidrólisis de ATP para que DnaC sea liberada del complejo DnaB·DnaC (Galletto, Jezewska y Bujalowski, 2003). También se han aislado complejos en los que conviven de manera estable DnaB y DnaG de *Bacillus stearothermophilus* con el cargador de la helicasa DnaI de *B. subtilis* (Soultanas, 2002; Liu, Eliason y Steitz, 2013). En un intento de reconciliar los distintos resultados se ha propuesto un

Introducción

tercer modelo en el que juegan un papel importante los cambios conformacionales que experimenta el doble anillo del complejo DnaB·DnaC (Figura 7 C) (Liu, Eliason y Steitz, 2013). Dicho complejo interaccionaría con ADNcs en un estado en el que los anillos de ambas proteínas se encontrarían abiertos, desencadenando tal interacción el cierre de la estructura, lo que a su vez facilitaría la disociación parcial de los monómeros de DnaC. La liberación total del cargador se produciría tras la incorporación de tres copias de la primasa DnaG al hexámero de DnaB y el inicio de la síntesis de RNA (Rannou *et al.*, 2013).

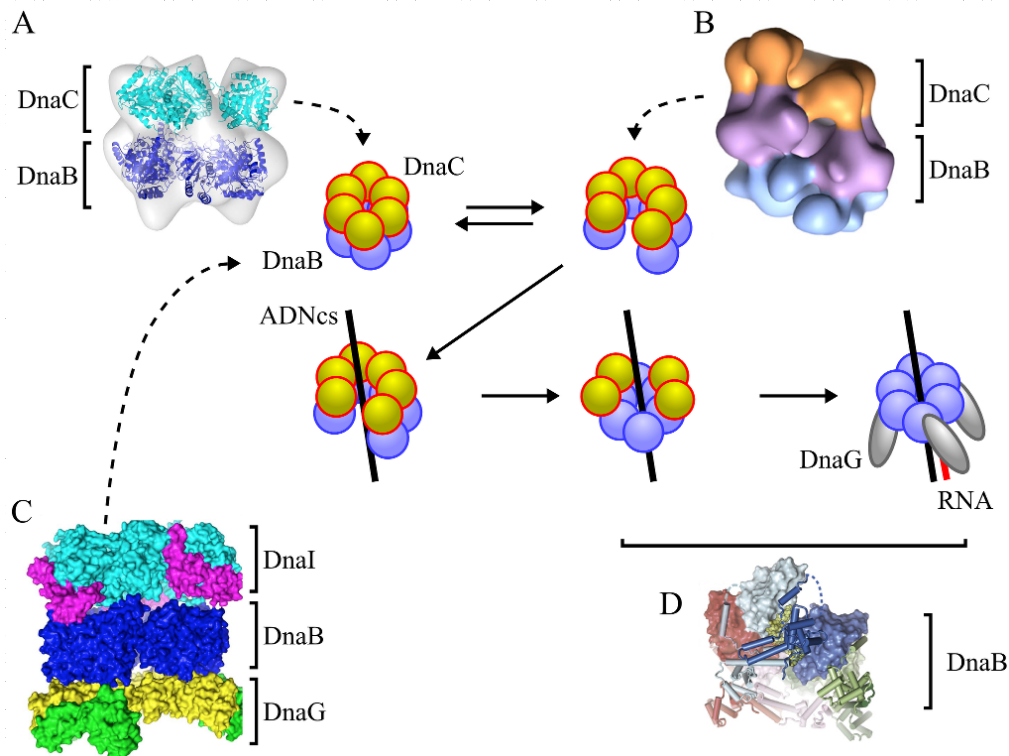


Figura 8. Transiciones estructurales del complejo DnaB·DnaC.

Se muestra un esquema de los cambios que se producen en los anillos de DnaB y DnaC, acompañado de estructuras representativas de los distintos estados: **A**) Reconstrucción 3D de imágenes de microscopía electrónica (ME) del complejo DnaB·DnaC en su forma de anillos cerrados (Bárcena *et al.*, 2001); **B**) Estructura ME del complejo en su estado de anillos abiertos en espiral (Arias-Palomo *et al.*, 2013); **C**) Estructura cristalográfica de anillos cerrados del complejo DnaB·DnaI·DnaG (únicamente contiene el dominio de interacción con la helicasa de DnaG; Liu, Eliason y Steitz, 2013); **D**) Estructura de cristalografía de rayos-X del anillo cerrado de DnaB en forma de espiral (anillo DNT cerrado, anillo DCT abierto; Itsathitphaisarn *et al.*, 2012).

La reciente obtención de un modelo del complejo DnaB·DnaC de *E.coli* mediante la técnica de reconstrucción 3D de imágenes de microscopía electrónica ha proporcionado nuevas claves para entender el proceso de cargado de DnaB en oriC (Figura 8 B; Arias-Palomo *et al.*,

2013). En tal modelo el anillo de DnaC se encuentra abierto y muestra una disposición en espiral que fuerza la remodelación de la configuración de los dominios amino terminales de DnaB y también la apertura del anillo de los dominios ATPasa dicha helicasa. Esta estructura abierta de DnaC recuerda a la estructura de otros cargadores, los que se encargan de introducir la abrazadera deslizante beta en el ADN para su uso por la ADN polimerasa (Kelch *et al.*, 2012). Asimismo, existe una estructura del cargador DnaB de la helicasa DnaC de *Bacillus subtilis* (esta bacteria posee dos cargadores, DnaI y DnaB; Velten *et al.*, 2003) que también recuerda al cargador de la abrazadera deslizante al encontrarse parcialmente abierto su anillo (Núñez-Ramírez *et al.*, 2007). La disposición abierta del doble anillo contrasta con resultados previos también obtenidos mediante técnicas de microscopía electrónica en los que se obtuvo una estructura cerrada (Figura 8 A; Bárcena *et al.*, 2001). También se ha resuelto a baja resolución una estructura cerrada del previamente comentado complejo DnaB·DnaI·DnaG mediante técnicas de cristalografía de rayos X (Figura 8 C; Liu, Eliason y Steitz, 2013). Teniendo en cuenta estas estructuras y resultados previos se ha propuesto un modelo que detalla las transiciones estructurales por las que pasa el complejo DnaB·DnaC desde su formación hasta la liberación de DnaC (Figura 8; Liu, Eliason y Steitz, 2013). Según este modelo el complejo DnaB·DnaC se encontraría en un equilibrio entre las formas de doble anillo cerrado (Figura 8 A y C) y doble anillo abierto en espiral (Figura 8 B), siendo probablemente este último la forma capaz de interactuar con ADNcs. La salida del cargador DnaC dejaría a la helicasa DnaB dispuesta en el ADN y lista para iniciar su actividad (Figura 8 D). Se presenta por lo tanto un mecanismo por el cual una helicasa hexamérica, que debería permanecer en principio cerrada para llevar a cabo su tarea, puede ser abierta de manera temporal en presencia de su cargador, para luego volver a cerrarse una vez interacciona con ADN.

1.6 Inicio de la replicación del bacteriófago SPP1.

El uso de virus para el estudio de distintas funciones celulares ha resultado ser una herramienta muy provechosa. En este sentido, en el caso del estudio de la replicación el análisis de los sistemas empleados por los virus ha resultado de bastante utilidad, puesto que o bien ha proporcionado respuestas paralelas a lo que ocurre con la maquinaria celular o ha abierto nuevas perspectivas al emplearse vías alternativas para resolver problemas comunes. Dentro de este marco se encuadra el bacteriófago SPP1, un fago virulento que infecta a *B. subtilis*. (Alonso *et al.*, 1997).

El genoma del fago en su forma madura consiste en una molécula líneal de cadena doble (45,4 kilobases) con extremos redundantes, que sirven para su circularización cuando dicho ADN es inyectado dentro de la bacteria. Si bien el proceso de replicación de dicho ADN

se lleva a cabo de manera similar al mecanismo explicado para *E.coli*, mediante una burbuja de replicación (mecanismo *theta*), en un determinado momento se pasa a un mecanismo tipo *sigma*, por un proceso dependiente de recombinación (Zecchi *et al.*, 2012), generándose copias concatenadas del genoma del fago (Figura 9 A). Es esta forma la que se emplea para el empaquetamiento del ADN dentro de la cabeza icosaédrica del fago (Alonso JC, Tavares P, Lurz R, 2006).

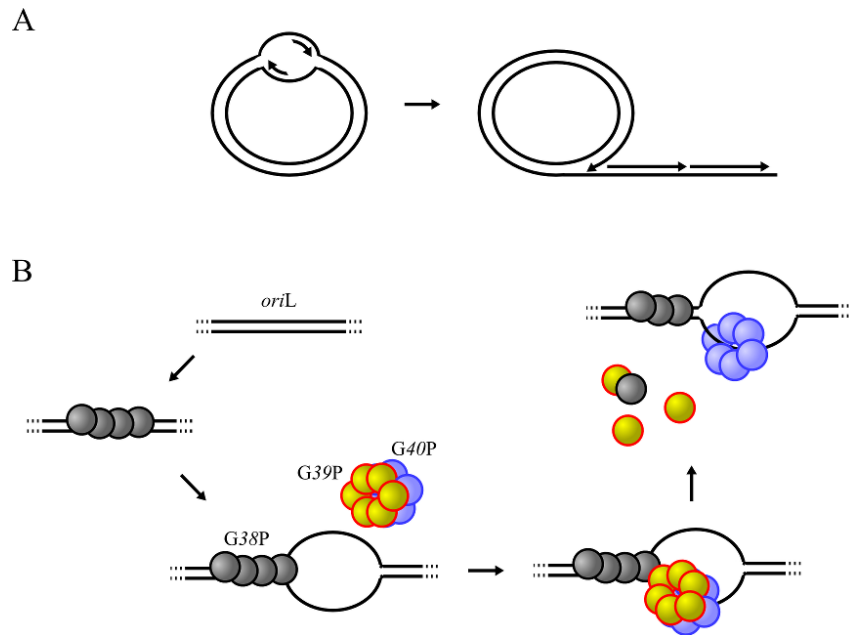


Figura 9. Replicación del fago SPP1.

A) Generación de copias concatenadas del ADN genómico de SPP1 mediante el paso de un mecanismo de replicación *theta* a uno *sigma*. **B)** Cargado mediado por G39P de la helicasa G40P en las inmediaciones del origen de replicación *oriL* activado por G38P.

El fago SPP1 de *B. subtilis* ha desarrollado un sistema de replicación en el que saca provecho de determinadas funciones celulares, siendo las más destacados las ADN polimerasas (polC y DnaE) y la primasa DnaG (Sanders, Dallmann y McHenry, 2010; Seco *et al.*, 2013), a la vez que proporciona otras proteínas propias que le permiten dirigir esa actividad de duplicación hacia el ADN que realmente le interesa replicar masivamente, su propio genoma. Estas proteínas propias del fago son la helicasa hexamérica G40P (Ayora *et al.*, 2002a; Bárcena *et al.*, 1998), el cargador de la helicasa G39P (Pedré *et al.*, 1994; Ayora, Stasiak y Alonso, 1999) y la proteína de unión a los orígenes de replicación G38P (Missich *et al.*, 1997). Su vinculación a las polimerasas celulares se lleva a cabo por medio de la interacción de G40P con la primasa DnaG (Ayora, Langer y Alonso, 1998) y la proteína tau, que la conecta con las ADN

polimerasas (Martínez-Jiménez, Mesa y Alonso, 2002). Así es como la helicasa replicativa de SPP1 es capaz de reclutar las polimerasas de su huésped a su propio origen de replicación (*oriL*), que es reconocido específicamente por G38P. Este iniciador de la replicación es capaz de abrir el ADNc adyacente y mediante su interacción con G39P, permite el cargado de G40P en las proximidades del origen de replicación (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999; Figura 9 B).

En el desarrollo de esta tesis se ha llevado a cabo la caracterización de las actividades y propiedades estructurales de las proteínas G40P y G39P, así como el análisis de la interacción que se establece entre ellas.

1.7 Helicasas como dianas de inhibidores.

Pequeñas moléculas naturales (Clardy y Walsh, 2004) han demostrado su incalculable valor cuando se ha aplicado su uso directamente en el área de la medicina y cuando su caracterización ha proporcionado nueva información sobre sus dianas directas, convirtiéndose así en poderosas herramientas para la investigación de sistemas biológicos. Desde un punto de vista farmacológico, considerar como dianas de drogas a las enzimas con actividad helicasa puede resultar una aproximación muy atractiva dado su papel en el mantenimiento de la integridad de la información genética, especialmente si se consideran aquellas helicasas que están a cargo de suministrar cadena sencilla a las polimerasas de ADN implicadas en el proceso de replicación. Así, los inhibidores específicos de estas proteínas pueden ser vistos como valiosas fuentes a partir de las que desarrollar agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer u otros desórdenes (Sharma, Doherty y Brosh, 2005; Xi, 2007; Gupta y Brosh, 2008; Sanyal y Doig, 2012). Distintos estudios se han llevado a cabo anteriormente con un amplio rango de compuestos químicos y diversas helicasas purificadas: distintas helicasas de *E.coli* (George *et al.*, 1992), la helicasa SV40 TAg (Bachur *et al.*, 1992; Bachur *et al.*, 1998), Rad3 de *Saccharomyces cerevisiae* (Naegeli, Modrich y Friedberg, 1993), la helicasa humana II (Tuteja *et al.*, 1997), RecQ de *E.coli* (Zhang *et al.*, 2008a), las helicasas Werner y Bloom (Brosh *et al.*, 2000), la ADN helicasa 45 del guisante (Pham y Tuteja, 2002), la helicasa MCM6 del guisante (Tran *et al.*, 2011), la helicasa RepA del plásmido RSF1010 (Xu *et al.*, 2001), la helicasa del virus de la hepatitis C (Borowski, Schalinski y Schmitz, 2002; Borowski *et al.*, 2002), etcétera.

A este respecto, un poliquétido aromático natural, heliquinomicina, fue identificado y aislado de *Streptomyces* sp. MJ929-SF2 como resultado de una búsqueda de nuevos inhibidores (Chino *et al.*, 1996). Se ha descrito su actividad como antibiótico puesto que puede inhibir la replicación de ADN y la síntesis de ARN. Este compuesto microbiano fue capaz de inhibir una

Introducción

helicasa humana aislada de células HeLa S3 y además se constató que inhibía el crecimiento de células tumorales (Chino *et al.*, 1998). Posteriormente, se comprobó que esta droga podía inhibir las funciones del complejo humano con actividad helicasa MCM4/6/7 (Ishimi *et al.*, 2009; Sugiyama *et al.*, 2012).

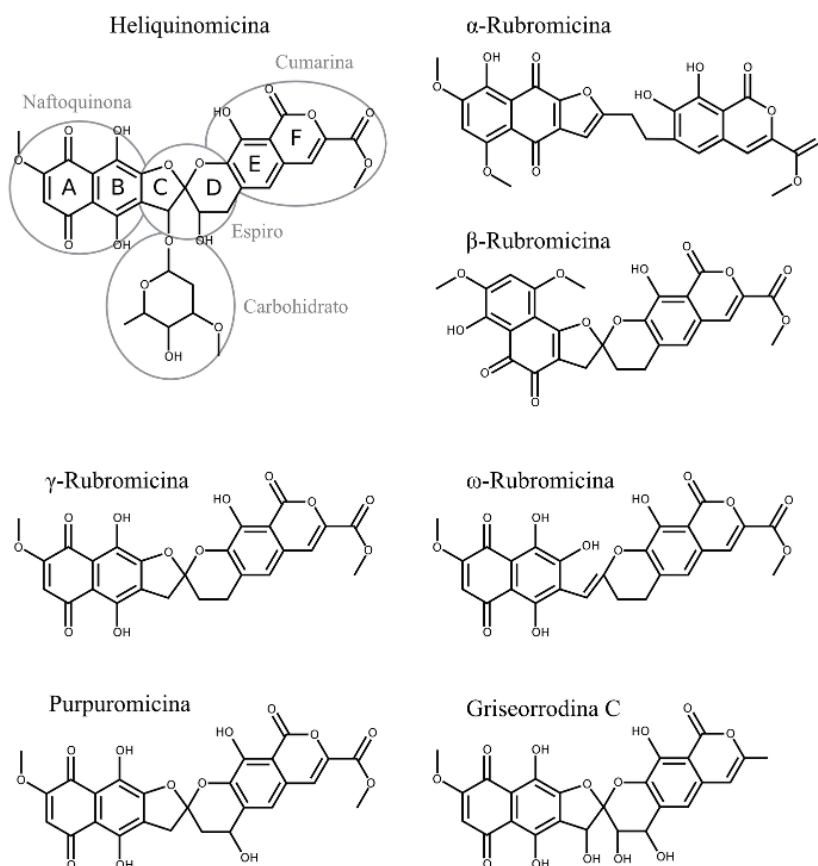


Figura 10. Estructuras químicas de los compuestos empleados como inhibidores de G40P.

Las principales subestructuras de estas moléculas se muestran en el esquema de la heliquinomicina y cada anillo se indica con una letra.

En el trabajo que se detallará más adelante (página 95) se estudió el efecto del compuesto heliquinomicina y otros poliquétidos naturales, relacionados con ella en base a su estructura química (Figura 10), en la actividad de G40P, tomada como modelo de helicasa replicativa hexamérica. La diferencia más llamativa de la estructura de la heliquinomicina con respecto al resto de los compuestos es la presencia de un carbohidrato unido a uno de los anillos (C, Figura 10), pero cada compuesto se diferencia de los demás en base a pequeñas

modificaciones. De esta manera, la idea central de este estudio se basó en que comprobando el efecto que las distintas moléculas tienen sobre la actividad de *G40P*, se puede verificar la importancia de las diferencias estructurales existentes entre los distintos compuestos.

2. Objetivos

Objetivos:

Esta tesis tuvo como objetivo general el estudio de la helicasa *G40P* y su cargador, *G39P*, centrándose en los siguientes puntos:

1 Desarrollo de un nuevo método de purificación de *G40P* valiéndose de la interacción que es capaz de establecer con *G39P*.

2 Análisis del papel de los dominios de *G40P* mediante la generación de variantes de delección y su caracterización bioquímica.

3 Caracterización de la proteína *G39P* y de su interacción con *G40P* mediante la generación de variantes de delección.

4 Estudio del mecanismo de cargado de *G40P* en ADN de cadena sencilla mediado por *G39P*.

5. Validación de compuestos químicos como posibles inhibidores de helicasas replicativas, empleándose como modelo *G40P*.

3. Materiales y Métodos

3.1 Enzimas y reactivos.

Las enzimas ExoIII, Exo VI y ExoVII fueron compradas a USB. La proteína RecA de *Escherichia coli* y la T4 polinucleótido kinasa se obtuvieron de New England Biolabs. Los nucleótidos trifosfato marcados [γ -32P]ATP y [α -32P]dATP (3000 Ci/mmol) se adquirieron a Amersham Biosciences y los nucleótidos ddATP, AMP-PNP, poly(dA) se consiguieron de Sigma. El ATP y las membranas de nitrocelulosa se compraron a Pharmacia. Las membranas DEAE (NA45) se obtuvieron de Schleicher and Schuell. Las placas PEI-celulosa se adquirieron de Merck. Las resinas Q-Sepharose y SP-Sepharose fueron compradas a Pharmacia y la resina Ni-NTA se obtuvo de Qiagen.

3.2 Oligonucleótidos y sustratos ADN de reacción.

A continuación se detallan los distintos oligos empleados en los ensayos helicasa expuestos en esta memoria (la concentración de los mismos se determinó por su absorbancia a 260 nm; fueron comprados a Sigma-Genosys): **1.1** (5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GGA CCG GTC GCG CCA CGC AGG-3'), **1.2** (5'- CCT GCG TGG CGC GAC CGG TCC GCC TGC GGG CCC ACG CCG TTC GGC GTG GGC CCG CAG GC-3'), **1.3** (5'-CCT GCG TGG CGC GAC CGG TCC-3'), **1.4** (5'-CCT GCG TGG CGC GAC CGG TCC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'), **1.5** (5'- GCA TGA CGG TCA GGC ACG TTC GTG CCT GAC CGT CAT GCG GAC CGG TCG CGC CAC GCA GG-3'), **1.6** (5'- GGA CCG GTC GCG CCA CGC AGG-3'), **1.7** (5'-GCC GCT TGG CTG CCA GCT CCG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'), **1.8** (5'-CGG AGC TGG CAG CCA AGC GGC-3'), **1.10** (5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CGG AGC TGG CAG CCA AGC GGC-3'), **1.11** (5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CGG AGC TGG CAG CCA AGC GGC GGA CCG GTC GCG CCA CGC AGG-3'), **1.12** (5'-CCT GCG TGG CGC GAC CGG TCC GCC GCT TGG CTG CCA GCT CCG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'), **1.13** (5'-CCT GCG TGG CGC GAC CGG TCC GCC TGC GGG CCC ACG CCG-3'), **1.14** (5'-CGG CGT GGG CCC GCA GGC-3'), **1.15** (5'- CGT GCC TGA CCG TCA TGC GGA CCG GTC GCG CCA CGC AGG-3'), **1.16** (5'-GCA TGA CGG TCA GGC ACG-3'), **1.18** (5'-CCT GCG TGG CGC GAC CGG TCC GCC GCT TGG CTG CCA GCT CCG-3'), **39/16 55-nt top**, (5'-GCT TGC ATG CCT GCA GG T CGA CTC TAG AGG ATC CCC GGG AAA AAA AAA AAA A-3') y **39/16 55-nt bottom** (5'-AAA AAA AAA AAA ACC CGG GGA TCC TCT AGA GTC GAC CTG CAG GCA TGC AAG C-3').

Los diferentes sustratos, variantes todos ellos de una horquilla de replicación típica, se obtuvieron con las siguientes mezclas de oligonucleótidos: **sh0** (oligonucleótidos 1.4 y 1.1*), **sh1** (1.2 y 1.1*), **sh2** (1.5 y 1.4*), **sh3** (1.3 y 1.1*), **sh4** (1.6 y 1.4*), **sh5** (1.6 y 1.3*), **sh6** (1.5 y 1.2*), **sh7** (1.13, 1.1 y 1.14*), **sh8** (1.4, 1.15 y 1.16*). También se emplearon los siguientes sustratos especiales (mezclas de 3 oligonucleótidos distintos): **sh9** [oligonucleótidos 1.2*b (marcado en sh9b), 1.7*a, (marcado en sh9a) y 1.11], **sh10** [1.5*b (sh10b), 1.8*a (sh10a) y 1.12], **sh11** [1.5*, 1.10 y 1.12], **sh24** [1.5*, 1.10 y 1.18] y **sh25** [1.5*, 1.8 y 1.18]; donde * indica el oligonucleótido que contiene la marca en el extremo 5'.

3.3 Marcaje de oligos.

Los ADNcs empleados en distintos ensayos se marcaron en su extremo 5' mediante el uso del enzima polinucleótido quinasa de T4 (PNK; New England Biolabs) y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Las cadenas sencillas de ADN marcadas se indican con un asterisco (*).

3.4 Soluciones empleadas.

Algunas de las soluciones comunes empleadas en los ensayos que se detallarán más adelante se indican a continuación:

- A (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM DTT, 5mM MgCl₂, 50mM NaCl, 50 mg ASB, 5% (v/v) glycerol),
- B (50 mM Hepes-NaOH, pH 7.5),
- C (50 mM Hepes-NaOH, pH 7.0),
- D (50 mM Pipes-NaOH, pH 6.8),
- E (50 mM Pipes-NaOH, pH 6.5),
- F (50 mM Mes-NaOH, pH 6.2) y
- G (50 mM Mes-NaOH, pH 6.0).

Las últimas 6 soluciones contenían también 1mM DTT, 10 mM MgCl₂, 15 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol and 50 µg/ml ASB.

3.5 Producción de proteínas.

Se emplearon los métodos habituales para clonación, transformación, expresión de proteína y purificación de ADN (Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, 1989). Se utilizaron

las cepas de E.coli XL1-Blue, para el mantenimiento de los plásmidos, y BL21(DE3)pLysS, para la expresión de proteínas (inducción por IPTG).

La proteína G40P se expresó empleando el plásmido pCB367, que contenía los genes 40 y 39, este último con una secuencia que codificaba por seis histidinas (en el extremo amino terminal de la proteína). La purificación del complejo h39-G40P se detalla en la parte de resultados de esta memoria (Figura 11). Mediante tal método se consiguió purificar de forma separada G40P y la proteína h39 (G39P con seis histidinas en N-terminal).

Las construcciones de delección de G40P y G39P (Figura 13 y Figura 41; se emplearon como origen de los respectivos genes los plásmidos pBT323 y pBT318) se obtuvieron mediante el uso de la proteína Exonucleasa III y la nucleasa Mung Bean (Clark y Henikoff, 1996) y fueron clonadas en tres versiones del plásmido pET3a (que al contener los sitios de multiclonaje de los plásmidos pEQ9, pEQ10 y pEQ11 permitían elegir la fase de lectura; por esa misma razón las proteínas generadas incluían una cola de histidinas). Los plásmidos obtenidos fueron los siguientes: G40PAN109 (pCB483), G40PAN175 (pCB679), hΔ39N14 (pCB359), hΔ39N22 (pCB360), hΔ39N28 (pCB364), hΔ39N55 (pCB363), hΔ39N73 (pCB661). Las construcciones hΔ39C69 (pCB365), h39I12 (pCB308) y G39P112 (pCB366) se obtuvieron mediante la introducción por técnicas de PCR de codones de terminación. Para la obtención de las fusiones hCFP39 y hYFP39 se emplearon los plásmidos pECFP y pEYFP, respectivamente (Clontech). La proteína hDnaG (pCB322) se obtuvo mediante el clonaje del gen correspondiente (pBT217) en el plásmido pET3a (que incluía el sitio de multiclonaje del plásmido pQE9). Todas estas proteínas, que incluían colas de seis histidinas, se purificaron mediante el uso de resina de níquel (Qiagen) y resinas de intercambio iónico (Q y SP).

3.6 Cromatografía por exclusión de tamaño.

Para el análisis de el estado de oligomerización del mutante G40PAN109 se empleó el método de gel filtración, utilizándose la siguiente solución : tampón Tris 50 mM, 5% Glicerol, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP. Se empleó una columna analítica Superose 12 10/300, a 4°C acoplada a un aparato FPLC (Amersham Pharmacia Biotech).

3.7 Ensayos EMSA.

La formación de complejos ADN-proteína se determinó inicialmente mediante ensayos de retardo en gel (EMSA) (Buratowski y Chodosh, 2001). Se incubó ADNcs poli(dT)₆₀ marcado con [γ ³²P] con distintas concentraciones de las proteínas de interés en la solución A suplementada con 2 mM AMP-PNP durante 15 minutos a 30°C. Los complejos ADN-proteína

se separaron del ADN libre en geles no desnaturalizantes del 8% de acrilamida en tampón Tris-Glicina pH 8.5 (25 mM Tris, 300 mM glicina, 2 mM MgCl_2) conteniendo 20 mM AMP-PNP (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999). Finalmente los geles se secaron sobre papel Whatman 3MM y se analizaron mediante la exposición en una pantalla “Phospor Imaging Screen-K”, su lectura en un “Bio-Rad Molecular Imager FX” y el uso del software “Quantity one” y/o “ImageJ”.

3.8 Ensayos de unión a doble filtro.

Reacciones de un volumen de 20 μl que contenían 0,2 nM ADNcs poly(dT)₁₅ marcado fueron incubadas por 10 minutos a 37°C en tampón C (pH 7,0) o tampón E (pH 6,5), conteniendo 2 mM AMP-PNP con las cantidades indicadas de G40P y G40PAN109. Las muestras fueron cargadas en un aparato de filtración (“Dot-Blot micro-filtration apparatus”, Bio-Rad) que contenía dos capas de filtros: un filtro de nitrocelulosa sobre un filtro tipo DEAE. El tratamiento realizado a los filtros y los distintos pasos de lavado se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Wong y Lohman, 1993). Los complejos ADNcs-proteína retenidos por el filtro de nitrocelulosa y el ADNcs libre unido al filtro de DEAE se analizaron mediante la exposición de los filtros en una pantalla “Phospor Imaging Screen-K”, su lectura en un “Bio-Rad Molecular Imager FX” y el uso del software “Quantity one” y/o “ImageJ”. De esta manera la razón ($\text{ADN}_{\text{unido}}/(\text{ADN}_{\text{total}})$) pudo ser obtenida para cada reacción. Los puntos mostrados en las gráficas son la media de al menos tres experimentos independientes.

3.9 Ensayos ATPasa.

La hidrólisis de ATP fue determinada por cromatografía de capa fina empleando láminas de PEI-celulosa (Merck) (Scott *et al.*, 1977). Las proteínas G40P o G40PAN109 fueron incubadas en tampón C (pH 7,0) o tampón E (pH 6,5) sin ATP durante 5 minutos a temperatura ambiente en presencia de las cantidades ADNcs indicadas en cada ensayo. Las reacciones, de 20 μl , se iniciaron con la adición de un mezcla de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y ATP “frío” (en un ratio 1*:100.000), se incubaron a 37°C y se detuvieron al añadir EDTA 250 mM (concentración final). Finalmente, las reacciones se desarrollaron en laminas de capa fina de PEI-celulosa con una solución de 0,4 M KPO_4 (pH 3,4). Las láminas se expusieron en una pantalla “Phospor Imaging Screen-K”, se llevó a cabo su lectura en un “Bio-Rad Molecular Imager FX” y la cuantificación del sustrato $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y del producto $[\gamma\text{-}^{32}\text{Pi}]$ se realizaron mediante el uso del software “Quantity one” y/o “ImageJ”. A fin de obtener datos de actividad ATPasa como velocidad inicial (v_0), al menos se tomaron cinco tiempos diferentes de incubación con ATP para cada condición experimental (abarcando desde 0,5 a 20 minutos), tratando de mantener lineal la pendiente de producción de Pi y procurando que la generación de producto se

mantuviera por debajo del 10%. Las concentraciones de proteína, ADNcs y de ATP se indican en el texto y figuras. La velocidad inicial de reacción ATPasa se expresa como moléculas de ATP hidrolizadas por segundo y por hexámero de proteína (s^{-1}). Los puntos mostrados en las gráficas son la media de al menos tres experimentos independientes.

3.10 Ensayos de protección de ADN.

Estos ensayos se realizaron sobre un tipo específico de sustrato de ADN en forma de horquilla de replicación, el sustrato 39/16, marcado de manera específica en sus distintos extremos 5' y 3' (Ayora *et al.*, 2002a; Soultanas *et al.*, 2000). G40P (12,5 y 25 nM) y G40PAN109 (35 y 70 nM) se incubaron durante 15 minutos a 20°C en tampón A en presencia o ausencia de 1mM AMP-PNP. A continuación se añadió una determinada nucleasa [ExoVII (0,2U), ExoIII(1U) o ExoVI(1U), según el ensayo a realizar] y se continuó la incubación otros 15 minutos. La reacción se detuvo con la adición de una solución de formamida con 25 mM EDTA y se calentó 5 minutos a 95°C. Los distintos productos generados se separaron en geles desnaturalizantes (urea) de poliacrilamida 15% (p/v) con TBE. Los geles se secaron y se analizaron por autorradiografía. Como marcador de peso molecular de un nucleótido se empleó [γ - ^{32}P]-poli(dA). ExoVII es una 3'→5' y 5'→3' exonucleasa específica de ADNcs; ExoVI es una 5'→3' exonucleasa específica de ADNcd; ExoIII es una 3'→5' exonucleasa específica de ADNcd.

3.11 Ensayos de actividad helicasa.

El objetivo de estos ensayos consistía en analizar cómo se producía la separación de las cadenas de sustratos de ADN mediada por la actividad helicasa de las proteínas utilizadas (Kaplan, 2000). Los distintos sustratos empleados para el análisis de la actividad helicasa se obtuvieron con las mezclas que se ha indicado previamente. Dichas mezclas de oligos se sometieron a una temperatura de 95°C durante 10 minutos y a continuación se procedió a bajar lentamente la temperatura hasta 25°C, promoviendo así el apareamiento de las cadenas complementarias. Dependiendo del valor de pH requerido en los ensayos se emplearon las soluciones B (pH 7,5), C (pH 7,0), D (pH 6,8), E (pH 6,5), F (pH 6,2) y G (pH 6,0). Las mezclas de reacción (10 μ l) contenían 0,2 nM de ADN sustrato (concentración de la hebra marcada). También incluían 1 mM ATP, a menos que se indique otra concentración en ensayos específicos. Las reacciones se iniciaban ($t=0$) con la adición de G40P o G40PAN109 y tras incubarse a 37°C un tiempo determinado se finalizaban al añadir solución de parada 2x [1,7 mg/ml Proteinasa K; 2,6 % (p/v) SDS; 170 mM EDTA; 180 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 % (v/v) glicerol; 0,02 % (p/v) bromophenol blue y 0,02 % (p/v) xylene cyanol] e incubarse de nuevo a

37°C durante 5 minutos. Los productos de las reacciones helicasa se analizaron en geles no desnaturalizantes del 12 % (p/v) acrilamida (TBE 1x, 200V y 25°C). Finalmente los geles se secaron sobre papel Whatman 3MM y se analizaron mediante la exposición en una pantalla “Phosphor Imaging Screen-K”, su lectura en un “Bio-Rad Molecular Imager FX” y el uso del software “Quantity one” y/o “ImageJ”. La actividad helicasa (%) se calculó como la cantidad relativa de oligonucleótido-marcado libre frente a la cantidad total de sustrato y producto. Los puntos mostrados en las gráficas son la media de al menos tres experimentos independientes.

3.12 Ensayos de hibridación de cadenas.

En estos ensayos se trataba de examinar la velocidad con la que cadenas complementarias de ADN de cadena sencilla eran capaces de hibridarse. Para ello se emplearon las cadenas sencillas de ADN que constituyen los sustratos de helicasa; principalmente se emplearon las correspondientes a los sustratos sh0 (oligonucleótidos 1.4 y 1.1*) y sh5 (1.6 y 1.3*). Las mezclas de cadenas de ADN se calentaban a 95°C durante 10 minutos e inmediatamente eran puestas en hielo para impedir su unión por complementariedad. Los controles de hibridación, que consistían en las mismas mezclas de ADN pero ahora completamente hibridadas, se obtenían calentándose las muestras durante 10 minutos a 95°C y a continuación dejando que se enfriaran lentamente hasta temperatura ambiente, favoreciendo su emparejamiento. Las reacciones se llevaron a cabo mezclando las muestras de ADN (0,2 nM de cada una de las hebras) con la proteína (G40P, G40PΔN109 o RecA) e incubando un determinado tiempo a 37°C. Se emplearon distintas soluciones dependiendo del pH deseado para la reacción, pero todas ellas basadas en 50 mM Hepes-NaOH (pH 7,5; 7,2; 7,0; 6,8), conteniendo NaCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM y 5% glicerol. En algunos casos estas soluciones eran suplementadas con ATP y/o G39P, a las concentraciones indicadas en los ensayos. Las reacciones se detuvieron al añadir solución de parada 2x [1,7 mg/ml Proteínasa K; 2,6 % (p/v) SDS; 170 mM EDTA; 180 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 % (v/v) glicerol; 0,02 % (p/v) bromophenol blue y 0,02 % (p/v) xylene cyanol], incubándose otros 5 minutos a 37°. Los productos de las reacciones de hibridación se cargaron en geles no desnaturalizantes del 12 % (p/v) acrilamida (TBE 1x, 200V y 25°C) y se analizaron de igual manera que los geles de reacciones helicasa. La actividad de hibridación (%) se calculó como la cantidad relativa de oligonucleótido-marcado hibridado frente a la cantidad total de sustrato y producto. Los puntos mostrados en las gráficas son la media de al menos tres experimentos independientes.

3.13 Ensayos de inhibición de la actividad de G40P.

En los ensayos se empleó la solución de reacción I, que contenía 50 mM Hepes-NaOH (pH 7,5), 1mM DTT, 200 μ M ATP, 1 mM $MgCl_2$, 15 mM NaCl, 5% (v/v) glicerol y 50 μ g/ml ASB. Todas las drogas usadas fueron disueltas en DMSO y se mantuvieron guardadas a -20°C en condiciones de oscuridad (todas ellas estaban dotadas de coloración). Debido a esto, los experimentos se diseñaron de tal manera que al añadirse las soluciones que contenían las drogas en las soluciones de reacción siempre se añadiese una cantidad final fija de DMSO (5 % concentración final).

Los ensayos de medida de actividad ATPasa se realizaron como se ha indicado previamente salvo en los aspectos que se detallan a continuación. Se empleó la solución I (20 μ l), a la que se añadió las cantidades indicadas de droga en presencia o ausencia de ADNcs [1,25 μ M d(pT)₃₀]. Las reacciones se iniciaron con la adición de G40P (210 nM monómeros, 35 nM hexámeros), se incubaron durante 10 minutos a 37°C y se pararon con EDTA 250 mM, concentración final. Las drogas se añadieron previamente a la adición de la proteína sin tiempo de pre-incubación, salvo que se indique lo contrario, con el fin de realizar ensayos de competición. Cuando se realizaron ensayos de pre-incubación, se mezclaron G40P y las diferentes drogas en la solución de reacción y se incubaron durante 5 minutos a 25°C, antes de la adición de 200 mM ATP (mezcla con ATP radiactivo 1*:100,000) que representa el inicio de la reacción (10 minutos a 37°C). La constante aparente K_i se define como la concentración de droga para la que la actividad ATPasa de G40P se ve disminuida al 50 \pm 5 % con respecto al control sin droga (pero que contiene 5 % DMSO). La actividad ATPasa caracterizada como velocidad inicial (v_0 , expresada como moléculas de ATP hidrolizadas por segundo y por hexámero de G40P, es decir s⁻¹) se calculó como se ha indicado previamente. Los puntos mostrados en las gráficas son la media de al menos tres experimentos independientes.

Para los ensayos helicasa se empleó el sustrato sh0 (cadena 1.1 marcada) y se realizaron como se ha indicado anteriormente, salvo por la siguientes excepciones. Las mezclas de reacción (20 μ l) contenían 0,2 nM sustrato de ADN en solución I. Todas las drogas se añadieron a las reacciones previamente a la adición del enzima. Las reacciones se iniciaron al añadir G40P (210 nM monómeros, 35 nM hexámeros) y se incubaron durante 5 minutos a 37°C. En este estudio de la inhibición de la actividad helicasa de G40P los valores de K_i representan la concentración de inhibidor necesaria para reducir la actividad helicasa en un 50 \pm 5 %. Los datos presentados son la media de al menos tres determinaciones independientes.

3.14 Ensayos de retención en resina de níquel.

Estos ensayos de cromatografía de afinidad se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1,5 ml en los que se depositó 20 µl de resina de níquel (Ni-NTA agarosa; Qiagen). Las mezclas de proteína (2 µg de cada una de ellas) se incubaron 30 minutos en hielo en un total de 100 µl de la siguiente solución de reacción: 50 mM tampón fosfato ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}/\text{PO}_4\text{HNa}_2$) pH 7,5; 2 mM 2-mercaptoetanol; 5 % glicerol; 50 mM NaCl; 10 mM imidazol. A continuación las muestras se centrifugaron para sedimentar la resina y la solución se retiró. Para eliminar la proteína no retenida se realizaron dos lavados de 200 µl con la misma solución de reacción y el mismo método anterior. Finalmente las proteínas unidas a la resina de Ni se eluyeron con 50 µl buffer de elución (misma composición que el buffer de reacción pero conteniendo 500 mM de imidazol). Las muestras se cargaron en geles de acrilamida 15 % tris-glicina (Laemmli, 1970) o 16% tris-tricina (Schägger y von Jagow, 1987; Schägger, 2006), dependiendo del tamaño de las proteínas a resolver.

3.15 Ensayos de proteólisis controlada.

La solución empleada en las reacciones tenía la siguiente composición: 50 mM tampón fosfato ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}/\text{PO}_4\text{HNa}_2$) pH 7,5; 0,5 mM DTT; 5 % glicerol; 50 mM NaCl. En cada reacción, de un volumen de 20 µl, se añadió 1 µg de cada una de las proteínas analizadas. Las reacciones se iniciaron con la adición de Proteinasa K (62 ng/reacción) y se incubaron a 37°C los tiempos indicados. La acción de la proteasa se detuvo al añadir solución de parada (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM PSMF; 400 mM glicina; 3 % 2-mercaptoetanol; 2 % SDS; 10 % glicerol; concentraciones finales) y las muestras se corrieron en geles de acrilamida con Tris-tricina del 16 % (Schägger, 2006). Los geles fueron analizados mediante el software “Quantity one” y/o “ImageJ”.

3.16 Entrecruzamiento químico de proteínas.

Las reacciones de entrecruzamiento de G39P se llevaron a cabo con el uso de glutaraldehído (Kulkarni y Summers, 1999; Barry *et al.*, 2007). La solución de reacción empleada fue la siguiente: tampón fosfato ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}/\text{PO}_4\text{HNa}_2$) pH 7,5; 0,5 mM DTT; 5 % glicerol; 50 mM NaCl. La proteína (2 µg) se incubó con las cantidades indicadas de glutaraldehído (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 mM; 0,01-0,1 %; preparado fresco desde un muestra guardada a -20°C del 5 % , 0,5 M) durante 30 minutos a 30°C en la solución de reacción descrita (20 µl). La reacción se terminó con la adición de 2 ml de 1 M TrisHCl pH 8,0 y se procesó como una muestra normal para ser cargada en geles de acrilamida-SDS.

En las reacciones de entrecruzamiento de G40P (2 μ g) se usó el agente EDC (Hayashi *et al.*, 2003) en la siguiente solución de reacción (20 μ l): 50 mM Hepes-NaOH pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,1 mM ATP; 0,5 mM MgCl₂; sin agente antioxidante. Las reacciones se incubaron durante 30 minutos a 30°C y se pararon con la adición de 300 mM Tris-HCl pH 8,0 y 10 mM 2-mercaptoetanol (concentraciones finales).

3.17 Entrecruzamiento por irradiación con luz UV de ADNcs y proteína.

Para poder capturar los complejos transitorios de G39P con ADNcs se empleó la técnica de entrecruzamiento con luz ultravioleta (Chodosh, 2001). La irradiación del ADN con luz UV produce la formación de radicales libres de purinas y pirimidinas, de manera que si hay una proteína lo suficientemente cerca de estos se establecerá un enlace covalente, produciéndose un entrecruzamiento del ADN con la proteína. En los ensayos se usó un ADNcs que contenía 30 timidinas [poli(dT)₃₀ ó T30], ya que las pirimidinas son hasta 10 veces más fotosensibles a UV que las purinas. Distintos tipos de aminoácidos pueden entrecruzarse con pirimidinas (cisteína, serina, metionina, lisina, arginina, histidina, triptófano, fenilalanina y tirosina), pero la formación del enlace dependerá de la cercanía y orientación de los residuos, así como de la dinámica de la interacción y de la exposición a la radiación. Dada la baja eficiencia del proceso de entrecruzamiento se emplearon concentraciones altas de proteína. El poli(dT)₃₀ utilizado estaba marcado radiactivamente en su extremo 5', empleándose una concentración de 0,8 nM por reacción (20 μ l). Este ADNcs se incubó a 30°C durante 5 minutos con la mezcla de proteína (1 μ g de cada una) en solución de reacción (50 mM Hepes-NaOH pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 5 % glicerol). Las reacciones en las que estaban presentes G40P o G40P y G39P contenían además 1 mM ATP, salvo que se indique lo contrario. A continuación las reacciones se depositaron en hielo, la tapa de los tubos eppendorf se abrió y las muestras se irradiaron con una lámpara de UV (254 nm), a una distancia de 5 cm y durante 5 minutos. Las proteínas no sufrieron daños aparentes al ser irradiadas (comprobado en geles de acrilamida-SDS, con tinción de azul Coomassie). Las muestras se cargaron en geles desnaturizantes (SDS, Tris-glicina) de acrilamida del 15 %. Una vez desmontado el gel, se expuso en una pantalla sensible "Phosphor Imaging Screen-K" que se escaneó en un "Bio-Rad Molecular Imager FX". El resultado se analizó con el uso del software "Quantity one" y/o "ImageJ".

3.18 Ensayos FRET.

Para la obtención de las medidas de fluorescencia se utilizó un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F2500 equipado con un termostato para el mantenimiento constante de la temperatura. Las muestras (80 μ l) contenían una mezcla equimolar de hCFP39 y hYFP39 (55 nM de cada una, 110 nM de la porción correspondiente a G39P) en solución de reacción (50 mM tampón fosfato ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}/\text{PO}_4\text{HNa}_2$) pH 7,5; 0,5 mM DTT; 5 % glicerol; 25 mM NaCl; 15 mM MgCl_2 ; 1 mM ATP). Según el ensayo a realizar se añadieron otras proteínas (94 nM G40P como monómero, por ejemplo) o se varió la composición de la solución de reacción y se incubó la muestra en una cubeta de cuarzo a 37°C durante 5 minutos. Transcurrido ese periodo de incubación se obtuvieron lecturas de fluorescencia en el rango de longitudes de onda de 450-600nm (abertura 5 nm) al ser excitada la muestra con radiación de una longitud de onda de 433 nm (abertura 2.5 nm). Esto permitió elaborar espectros de emisión, a partir de los cuales se pudo evaluar si se producía o no transferencia de energía de resonancia. Igualmente se tomaron los valores de fluorescencia a 476 nm (pico de emisión de CFP) y a 528 nm (pico de emisión de YFP) para calcular la razón $\text{Fluorescencia}_{528\text{nm}}/\text{Fluorescencia}_{476\text{nm}}$ [indicada en el texto como $R(528/476)$], que fue empleada como cuantificador del fenómeno FRET (que cuando se producía dio lugar a la disminución de la intensidad de fluorescencia en el pico a 476 nm y el aumento del pico a 528 nm, haciendo aumentar dicha razón). Los datos finales de los experimentos fueron analizados y procesados empleando el programa informático “FL Solutions”.

4. Resultados

G40P juega un papel esencial en la replicación del bacteriófago SPP1, siendo el punto en el que las maquinarias específicas de *Bacillus subtilis* y del fago concurren ya que esta helicasa hexamérica replicativa es capaz de secuestrar las polimerasas de la bacteria implicadas en el proceso de replicación (Martínez-Jiménez, Mesa y Alonso, 2002; Seco *et al.*, 2013). Los resultados que se muestran a continuación trataron de esclarecer el papel de G40P y G39P en el inicio de la replicación del ADN de SPP1, así como las características estructurales que hacen que puedan desarrollar sus actividades.

4.1 Purificación de G40P.

La helicasa replicativa G40P es lábil (Ayora *et al.*, 2002a). Con el fin de optimizar su purificación, sin introducir ninguna modificación en la proteína, se diseñó un nuevo sistema de producción en el que se expresaban de manera concurrente, bajo el mismo promotor inducible por IPTG, los genes 39 y 40. En la región 5' del gen 39 se añadió una secuencia codificante por 6 histidinas (cola de histidinas) de manera que la proteína resultante, h39, era capaz de unirse a resina de níquel. De hecho tal construcción respetaba el orden y la secuencia en la que se expresan ambos genes en la naturaleza, siendo parte de uno de los operones de expresión temprana del fago SPP1 en *Bacillus subtilis* (Pedré *et al.*, 1994; Alonso *et al.*, 1997). Utilizando este sistema se pudo obtener una buena expresión de las dos proteínas y, dado que en presencia de ATP-Mg se favorece la interacción entre G39P y G40P, se procedió a la purificación simultánea de ambas (Figura 11). Si bien se esperaba que al retirar el ATP de la solución de

purificación se podría forzar la separación de G40P, lo que facilitaría en extremo su purificación, el complejo se mantuvo parcialmente estable. Con el fin de forzar la separación total del complejo a continuación se empleó la capacidad de G40P de unirse a la resina de intercambio aniónico Q, promoviéndose la salida de h39 al realizarse lavados intensivos a una concentración de sal moderada (100 mM NaCl), condiciones bajo las que G40P se mantiene unida. De esta manera se consiguió obtener por un lado una preparación de G40P de una elevada pureza y por otro la proteína h39, que se pudo recuperar de los lavados realizados en la resina Q al volver a cargarla en una columna de níquel. Otra de las ventajas de este método es que al recaer todo el proceso de purificación en una interacción específica entre dos proteínas se

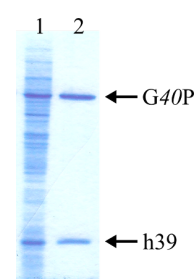


Figura 11. Expresión y purificación del complejo h39-G40P.

Las proteínas G40P y h39 (G39P con cola de histidinas en la posición amino terminal) fueron expresadas en la cepa BL21(DE3)pLysS (calle 1 en el gel), siendo el complejo formado por ambas proteínas purificado mediante el uso de resina Ni-NTA (calle 2).

evita la purificación de proteínas del huésped con actividades y comportamientos cromatográficos equivalentes (DnaB de *E. Coli* y otras helicasas).

4.2 Caracterización inicial de G40P.

Continuando con el trabajo de caracterización de las actividades enzimáticas de G40P que se había iniciado anteriormente, se estudió el comportamiento de la nueva preparación de proteína verificándose positivamente todas sus actividades (Ayora *et al.*, 2002a). El análisis de cada una de estas actividades de G40P se detallarán en los siguientes apartados de manera comparativa, profundizando únicamente a continuación en la actividad ATPasa (entendida como capacidad de hidrólisis de ATP y producción de ADP y Pi). Se pudo comprobar que G40P presenta una cinética de ATPasa particular, caracterizada por experimentar inhibición por sustrato, es decir, a medida que se aumenta la concentración de ATP la actividad ATPasa aumenta, hasta llegar a un valor determinado de concentración (en torno 0,5 mM) a partir del cual la velocidad de consumo de ATP empieza a disminuir. Este comportamiento se pudo observar tanto en presencia como en ausencia de ADNcs (Figura 12 A), que estimula fuertemente la actividad ATPasa de G40P al ser el sustrato sobre el que naturalmente se desplaza la proteína para llevar a cabo su actividad helicasa. Además esta pauta se manifiesta independientemente del tipo de ribonucleótido trifosfato empleado (Figura 12 B), si bien la actividad máxima se consigue con ATP, denotándose que el sitio de unión de nucleótido y la actividad de G40P como helicasa están específicamente diseñados para tal molécula (Ayora *et*

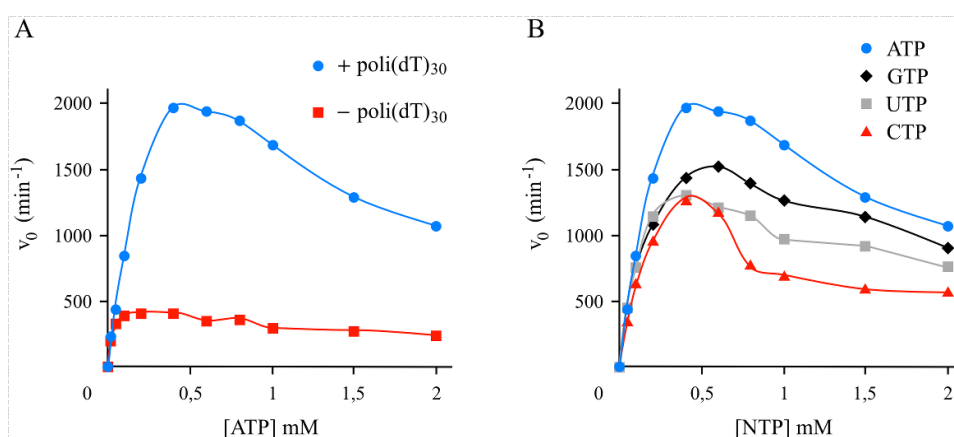


Figura 12. Caracterización de la inhibición por sustrato de la actividad ATPasa de G40P.

A) Efecto de la concentración de ATP en la actividad ATPasa de G40P (60 nM) en presencia y ausencia de ADNcs, en este caso 5 μ M poli(dT)₃₀. **B)** Comparación de la actividad NTPasa de G40P (60 nM) en presencia de 5 μ M poli(dT)₃₀ en función del ribonucleótido suministrado como sustrato.

al., 2002a).

4.3 Variantes de delección de G40P.

Con el fin de diseccionar la relación entre las distintas actividades que engloban la función helicasa de G40P y su relación con los distintos dominios estructurales que la constituyen se generaron varias construcciones de delección derivadas del gen 40, de manera que a cada una de las correspondientes proteínas le faltase una parte de la secuencia amino terminal. De entre todos estos mutantes de delección dos resultaban especialmente interesantes dada la información estructural de que se disponía en el momento de su obtención (Figura 13). Estas eran las construcciones que daban lugar a las proteínas G40PΔN109 y G40PΔN175, caracterizadas por la ausencia del dominio amino terminal y la presencia o ausencia de la

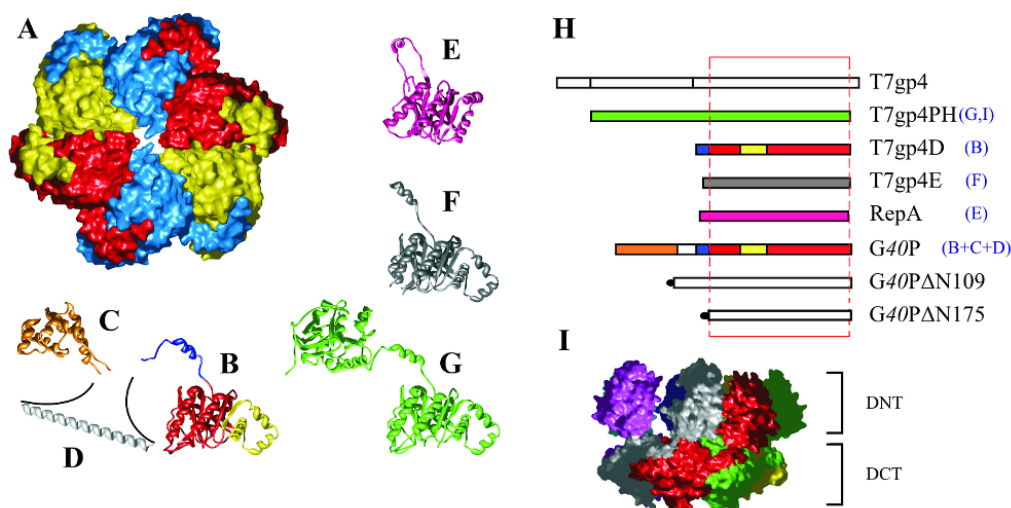


Figura 13. Modelo estructural de G40P.

Partiendo de las estructuras disponibles de las subunidades de las helicasas hexaméricas T7gp4 (**B**, **F**, **G**) y RepA (**E**), así como de la estructura del dominio amino terminal de DnaB (**C**) se obtuvo un modelo de la posible estructura de una subunidad de G40P. Este modelo se representa como la suma del dominio carboxilo terminal (DCT, **B**), el dominio amino terminal (DNT, **C**) y la secuencia de conexión entre ambos dominios (**D**). Tal subunidad debería integrarse en el hexámero de una manera similar a como se representa en la vista frontal de la estructura de T7gp4D (**A**) y la vista lateral de la estructura de T7gpPH (**I**, donde DCT y DNT se corresponden con los dominios helicasa y primasa respectivamente). La interacción entre subunidades adyacentes se establece entre una región del dominio carboxilo terminal (en amarillo en **B** y **H**) y una parte de la proteína que sirve de enlace entre los dos dominios (en azul en **B** y **H**). En **H** se muestra una comparación de las secuencias de las distintas proteínas representadas y la extensión de las proteínas G40PΔN109 y G40PΔN175. Referencias de las estructuras: A y B (Singleton *et al.*, 2000); C (Fass, Bogden y Berger, 1999); E (Nieden zu *et al.*, 2001); F (Sawaya *et al.*, 1999); G e I (Toth *et al.*, 2003).

secuencia de conexión, respectivamente (Figura 13).

4.4 Caracterización comparativa de G40PΔN109.

Si bien el mutante de delección G40PΔN109 presentaba actividad y permitió realizar un análisis comparativo teniendo como referencia a G40P, la variante G40PΔN175 resulto ser bastante inestable y aunque pudo ser purificada no presentaba ninguna de las actividades características de G40P, ni siquiera era capaz de formar hexámeros.

4.4.1 Estabilidad de G40PΔN109.

Durante la purificación de la proteína G40PΔN109 quedo patente que no resultaba ser tan estable como la versión natural G40P (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999; Ayora *et al.*, 2002a), aunque no llegaba al extremo del mutante G40PΔN175. En este sentido el análisis del estado de oligomerización de G40PΔN109 mediante cromatografía de exclusión por tamaño reveló que si bien la proteína era capaz de formar hexámeros, estos eran bastante sensibles a disociarse en presencia de concentraciones relativamente altas de sal (300 mM NaCl), de manera dependiente de la concentración de proteína (Figura 14). También presentaba una mayor tendencia a formar agregados y precipitar. Esta relativa inestabilidad se manifestó en algunas de las medidas de

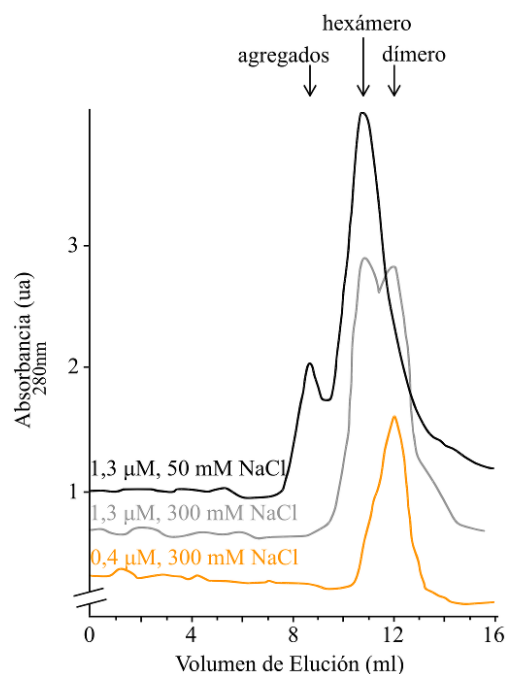


Figura 14. Estabilidad de G40PΔN109 en experimentos de cromatografía de filtración en gel.

Se muestran tres distintos perfiles cromatográficos en los que varían las concentraciones de sal y proteína. Asimismo, se indican los volúmenes de elución correspondientes al hexámero y al dímero de G40PΔN109 (determinados por el uso de proteínas control de tamaño conocido).

actividad que se detallarán a continuación, haciendo que se precisaran bajas concentraciones de sal en los ensayos y mayor cantidad de proteína que cuando se empleaba G40P.

4.4.2 Unión a ADNcs.

El análisis inicial de la actividad de G40PΔN109 mostró que su actividad helicasa era bastante más baja que la de G40P y además resultaba ser característicamente dependiente del pH. Con el fin de optimizar la actividad helicasa de este mutante y a la vez caracterizar los puntos débiles que contribuyen a disminuir su actividad, se realizó un estudio de las distintas actividades de este mutante, entre ellas la capacidad de unión a ADN de cadena sencilla.

Al realizarse ensayos de retardo en gel (Figura 15) pudo comprobarse que en el caso de G40PΔN109 se precisa una mayor cantidad de proteína para formar complejos estables, si bien estos resultaban ser similares a los formados por G40P (Ayora *et al.*, 2002a). En este sentido, hasta tres hexámeros del mutante pueden unirse a una molécula de ADNcs (60 nucleótidos), mientras que G40P lo hace solo con dos hexámeros, dando cuenta de la diferencia de tamaño que hay entre ambas proteínas y por lo tanto el espacio que cubren sobre el ADN. Como puede observarse, sobre todo a elevadas concentraciones, G40PΔN109 tiende a agregar y retiene el ADNcs en el pocillo. En presencia del agente químico glutaraldehído se requieren menores concentraciones de G40PΔN109, sugiriendo que el complejo puede tener una corta vida media (Martínez-Jiménez, Mesa y Alonso, 2002).

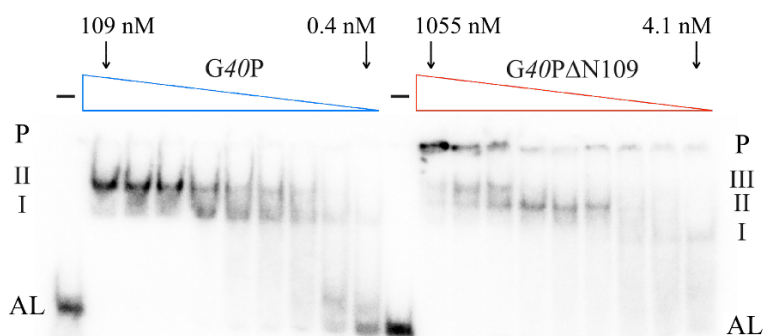


Figura 15. Análisis de la unión de G40PΔN109 a ADNcs en ensayo de retardo en gel.

Para el ensayo distintas concentraciones de G40P (109; 55; 27; 14; 6,8; 3,4; 1,7; 0,8 y 0,4 nM hexámero) y G40PΔN109 (1055; 528; 264; 132; 66; 33; 16,5; 8,2 y 4,1 nM hexámero) se incubaron en presencia de 1 mM AMP-PNP con 0,2 nM poli(dT)₆₀ marcado (0,2 nM). Los distintos complejos que se resuelven en el gel se denotan como I, II y III. Con P se indica la presencia de ADNcs marcado en los pocillos del gel de acrilamida, AL muestra la posición del ADNcs libre y (–) indica la muestra que solo contiene ADNcs y no proteína.

Resultados

Con el fin de examinar el comportamiento de unión a ADNcs empleando un tamaño más ajustado al mínimo que *G40P* es capaz de unir, minimizando así la formación de complejos múltiples de distintos tamaños, preservar lo más posible la estabilidad de *G40P* Δ N109 y además para poder probar distintos valores de pH, se optó por emplear el método de unión a doble filtro (Wong y Lohman, 1993). Empleando este método la concentración de proteína necesaria para obtener el 50% del ADNcs unido puede estimarse fácilmente (Figura 16): para *G40P*, 3 nM a pH 7,0 y 7 nM a pH 6,5; para *G40P* Δ N109, 10 nM a pH 7,0 y 35 nM a pH 6,5. De estos datos se desprende que ambas proteínas unen mejor el ADNcs a pH 7,0 (se precisa en torno a 3 veces menos proteína que a pH 6,5). Cabe destacarse que las curvas de titulación también presentan una diferencia clara cuando se comparan globalmente, a pH 6,5 presentan un componente de crecimiento sigmoideo mas acentuado que a pH 7,0, no se trata simplemente de que se desplacen a mayores valores de concentración de proteína. Esto podría indicar distintos modos de unión al ADN, dependientes del pH del medio. Además, se corrobora que *G40P* presenta mejor unión a ADNcs que *G40P* Δ N109, aproximadamente 3 veces mejor a pH 7,0 y 5 veces mejor a pH 6,5 (12 veces mejor si se compara *G40P* a pH 7,0 con *G40P* Δ N109 a pH 6,5). Con todo esto, la mayor ineficiencia como helicasa de *G40P* Δ N109 podría explicarse, al menos parcialmente, por su peor capacidad de unión a ADNcs.

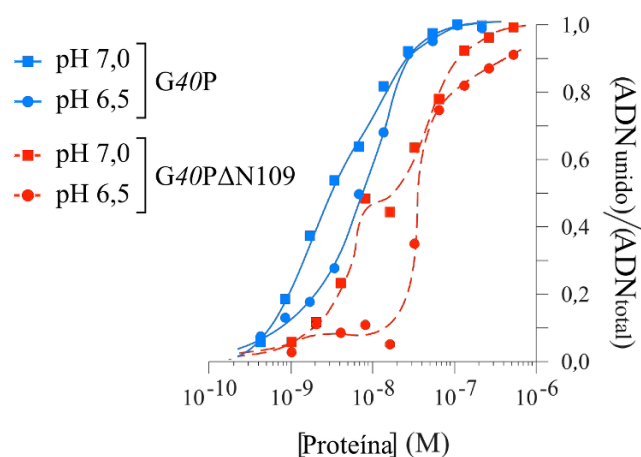


Figura 16. Unión a ADNcs de *G40P* y *G40P* Δ N109 determinada por ensayos de doble filtro.

Los ensayos se realizaron con un oligonucleótido poli(dT)₁₅ a los valores de pH indicados en presencia de 2 mM AMP-PNP y de las concentraciones de proteína especificadas (como hexámeros).

4.4.3 Actividad ATPasa.

Al examinar la dependencia a ADNcs de la actividad ATPasa de G40PΔN109 se pudo comprobar que esta era bastante más acusada que la de G40P (Figura 17). La presencia de ADNcs parece tener un efecto de estabilización en el mutante que se refleja en una fuerte estimulación de su actividad ATPasa, haciendo que sea 56 veces mayor. En el caso de G40P esta estimulación hace que su actividad sea 10 veces mayor en presencia de ADNcs.

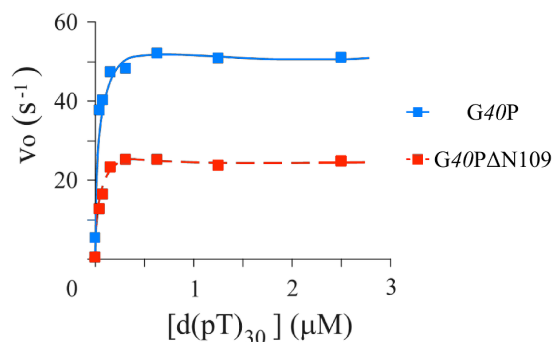


Figura 17. Actividad ATPasa dependiente de ADNcs de G40P y G40PΔN109.

Ambas proteínas (35 nM, como hexámeros) se incubaron en presencia de 1 mM ATP a pH 7,0 con las cantidades indicadas de ADNcs.

Al analizar el comportamiento de la actividad ATPasa de ambas proteínas en función de la concentración de sustrato (Figura 18) se observó que las dos presentaban inhibición por sustrato (Bird *et al.*, 2000; Ayora *et al.*,

2002a). La actividad ATPasa se incrementa rápidamente hasta que se alcanza una concentración en torno a 1 mM, a partir de ahí la actividad disminuye según aumenta la concentración de ATP.

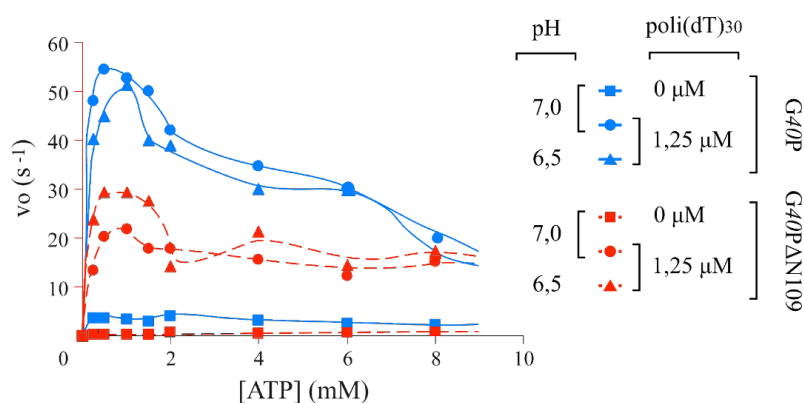


Figura 18. Inhibición por sustrato en la actividad ATPasa de G40P y G40PΔN109.

Representación de la actividad ATPasa de ambas proteínas (35 nM) en función de la concentración de sustrato, bajo distintas condiciones de pH y en presencia o ausencia de 1,25 μM poli(dT)₃₀.

Este comportamiento además se presenta tanto en presencia como en ausencia de ADNcs y para los dos valores de pH examinados. A parte de esto, la actividad ATPasa de ambas proteínas no se ve prácticamente afectada por la variación de pH y en general los valores que se alcanzan en

Resultados

el caso de *G40P*, en presencia de ADNcs, suelen ser en torno al doble de los de *G40PΔN109*. Con todo esto la actividad ATPasa de *G40PΔN109* parece verse afectada solo parcialmente en presencia de ADNcs, aunque cuando no hay ADNcs presente sí que se ve fuertemente deteriorada.

4.4.4 Ensayos de protección de ADN.

Dado que previamente se había comprobado que de manera característica *G40P* protegía de la actividad de exonucleasas las partes de ADNcs y ADNcd de un sustrato en forma de horquilla de replicación (Ayora *et al.*, 2002a), se decidió comparar tales resultados con las protecciones que pudiesen darse sobre ese mismo sustrato de ADN en presencia de *G40PΔN109*.

Al emplearse el enzima ExoVII (exonucleasa 3'→5' y 5'→3' específica de ADNcs) pudo comprobarse que *G40PΔN109* repetía el patrón de protección de *G40P* en el brazo 5' del sustrato y que igualmente era dependiente de la presencia de AMP-PNP (Figura 19 A). Cuando se examinó qué ocurría en el otro brazo del sustrato, el 3', sorprendentemente se observó que *G40PΔN109* era capaz de protegerlo de manera similar a como hacía con el brazo 3' (Figura 19 B). Sin embargo *G40P* únicamente producía una protección marginal, probablemente debida a

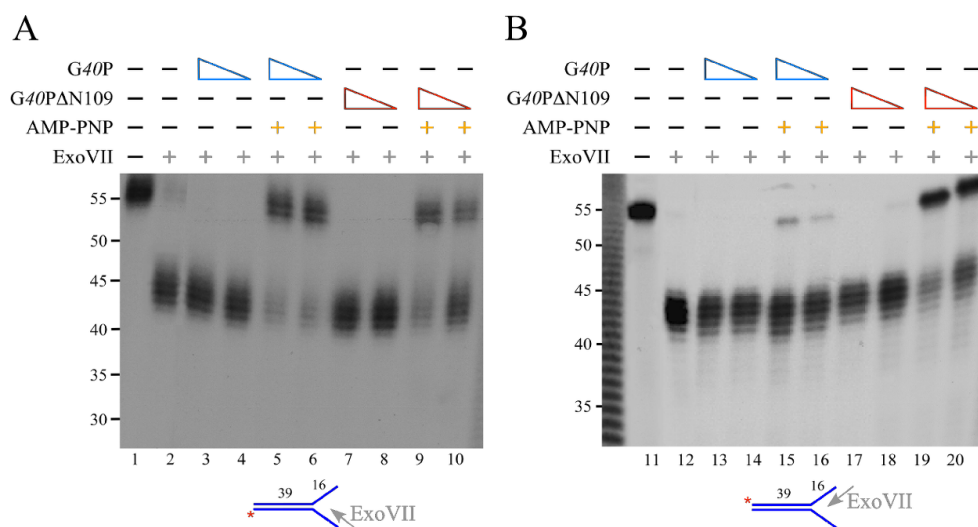


Figura 19. Ensayos de protección de ADNcs con ExoVII.

La protección del sustrato en forma de horquilla de replicación (0,5 nM) se testeó en presencia de *G40P* (12,5 o 25 nM), *G40PΔN109* (35 o 70 nM) y AMP-PNP (1 mM). Al introducir la marca radiactiva en distintos extremos de este ADN se pudo analizar la manera en que se protegían de la acción de la exonucleasa los brazos de ADNcs 5' (A) y 3' (B), donde se produce el cargado de las helicasas. El asterisco señala el extremo marcado en el sustrato y la flecha indica la dirección de la actividad exonucleasa detectada en los geles.

que si bien la proteína es capaz de unirse a los dos brazos, únicamente el brazo 5' es compatible con la polaridad 5'→3' de su actividad helicasa. Solo esa última unión es estable en presencia de AMP-PNP, tal vez por contactos adicionales con la zona de doble cadena (Ayora *et al.*, 2002a).

Para examinar qué sucedía con la parte de doble cadena adyacente a los brazos de cadena sencilla se emplearon las enzimas ExoVI (exonucleasa 5'→3' específica de ADNcd) y ExoIII (exonucleasa 3'→5' específica de ADNcd). De nuevo G40PAN109 era capaz de emular los resultados de G40P, produciendo una protección adicional de la zona de doble cadena del sustrato (unos 5 nucleótidos) cuando se examina la cadena complementaria a aquella en la que se carga G40P (Figura 20 A). Pero a la vez que el mutante era capaz de proteger de forma equivalente la otra hebra de ADN en dicha zona fronteriza de cadena doble, G40P únicamente

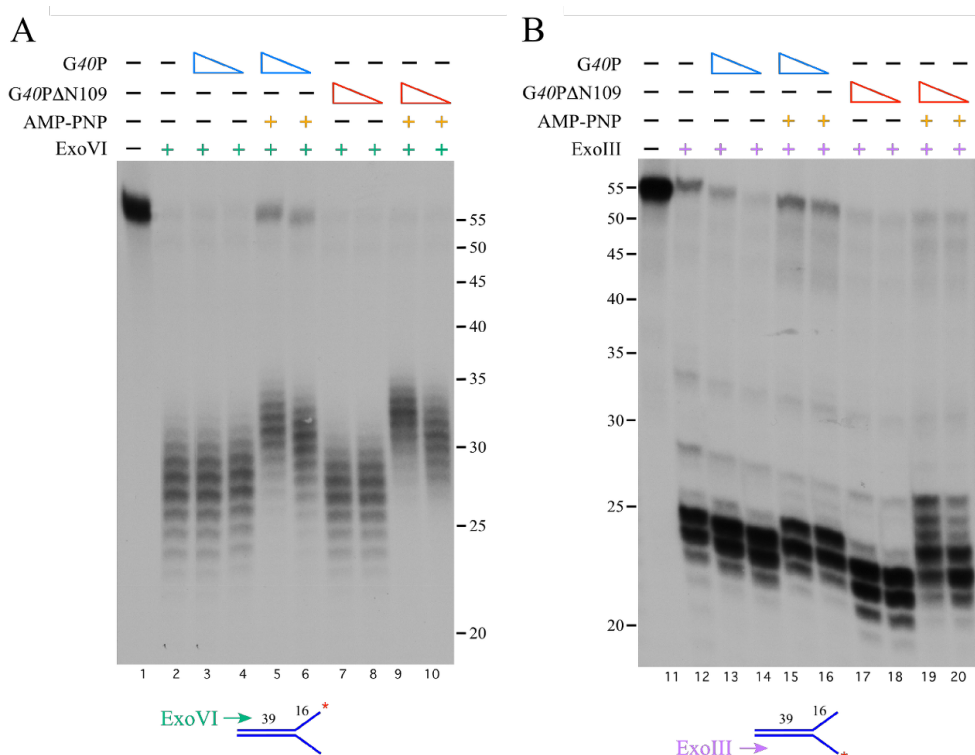


Figura 20. Ensayos de protección de ADNcd con ExoVI y ExoIII.

La protección del sustrato en forma de horquilla de replicación (0,5 nM) se testeó en presencia de G40P (12,5 o 25 nM), G40PAN109 (35 o 70 nM) y AMP-PNP (1 mM). Al introducir la marca radiactiva en los dos distintos brazos de ADNCs, 3' en (A) y 5' en (B) se pudo analizar la manera en que se protegía de la acción de las exonucleasas ExoVI (A) y ExoIII (B) la zona de ADNcd del sustrato. El asterisco señala el extremo marcado en el sustrato y la flecha indica la dirección de la actividad exonucleasa.

Resultados

producía una protección adicional de 1 nucleótido (Figura 20 B). Estas protecciones podrían interpretarse como contactos físicos directos de las helicasas con la zona de cadena doble o como restricciones indirectas de acceso a esa zona impuestas por la simple presencia de las helicasas. También podrían interpretarse como una desestabilización de la zona de doble cadena que se puede producir en la frontera con los brazos de cadena sencilla (eso limitaría la acción de las exonucleasas empleadas, que son dependientes de ADNcd). El hecho de que G40P produzca una protección asimétrica, en principio debería excluir esa tercera posibilidad (Ayora *et al.*, 2002a). En cualquier caso estos resultados dan cuenta de un comportamiento característico de estas proteínas y de su posicionamiento en un sustrato que simula una horquilla de replicación.

Asimismo puede apreciarse un efecto específico de G40P, la protección del ADN completo en presencia de AMP-PNP (Figura 20), si bien esta se da solo en una fracción pequeña del sustrato. Este hecho podría explicarse por la débil unión de G40P a ADN de cadena doble, lo que impediría la acción de las exonucleasas VI y III. Previamente ya se había descrito que la afinidad de G40P por cadena doble es mucho mas baja que por cadena sencilla (Ayora *et al.*, 2002a; Weise, 1997).

Por lo tanto mientras que G40P produce una protección asimétrica de la zona de doble cadena contigua a los brazos de cadena sencilla, G40PΔN109 protege simétricamente esa zona de igual manera que resguarda simétricamente ambos brazos de ADNcs. En este sentido G40PΔN109 sería capaz de interaccionar de manera estable con los dos brazos de un sustrato con forma de horquilla de replicación.

4.4.5 Actividad Helicasa en distintos sustratos.

Puesto que ninguna de las actividades previamente tratadas, necesarias todas ellas para el desarrollo de la función helicasa, parecía verse completa e irreparablemente afectada y se habían encontrado ciertas particularidades en la manera de unir el ADNcs por parte de G40PΔN109, se decidió estudiar de manera detallada su actividad helicasa, con el fin de optimizarla y caracterizarla desde los valores residuales de actividad que se detectaron en un primer momento. En este sentido, se diseñó un conjunto de sustratos (Figura 21) que cubrían

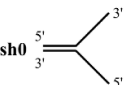
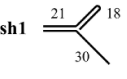
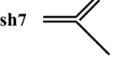
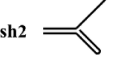
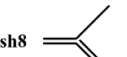
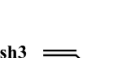


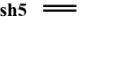
	G40P	G40PΔN109
sh0 	+	+
sh1 	+	+
sh7 	+	+
sh2 	+/-	+
sh8 	+/-	+
sh3 	-	-
sh4 	-	-
sh5 	-	-
sh6 	+/-	-

Figura 21. Sustratos empleados para el estudio de la actividad helicasa.

Cada sustrato se identifica con un número y se muestran sus principales características: longitud de cada elemento, naturaleza de cadena doble o sencilla de los brazos y localización de los extremos 3' y 5'. A modo de resumen se indica la actividad helicasa que tanto G40P como G40PΔN109 son capaces de desarrollar empleando cada uno de ellos (+ denota actividad helicasa, - carencia de ella y +/- actividad relativamente baja).

distintos aspectos de las características de la actividad helicasa (Kaplan y Steitz, 1999; Kaplan, 2000; Kaplan y O'Donnell, 2002; Ayora *et al.*, 2002a). Así, las hebras del sustrato sh0 pueden ser separadas tanto por una actividad helicasa con polaridad 5'→3' como por una con polaridad 3'→5'. El sustrato sh1 es susceptible de ser desenrollado por una helicasa con polaridad 5'→3' (puesto que solo dispone de un brazo de ADNcs sobre el que la proteína pueda cargarse), por el contrario el sustrato sh2 es sensible a la acción de una helicasa 3'→5'. Los sustratos sh7 y sh8 son equivalentes a sh1 y sh2, respectivamente, y se emplearon para verificar que la estructura con ADN curvado de los primeros no afectaba a la actividad helicasa. Con los sustratos sh3, sh4 y sh5 se verificó la necesidad de la existencia de dos brazos para que la actividad helicasa pueda desarrollarse (Jezewska *et al.*, 1998; Kaplan, 2000; Ayora *et al.*, 2002a). También se diseñó un sustrato, sh6, que mantenía la forma de una horquilla de replicación pero en el que ambos brazos resultaban ser de cadena doble.

Resultados

Tanto *G40P* como *G40PΔN109* eran capaces de separar las cadenas de algunos de estos sustratos, siendo el principal rasgo distintivo la capacidad de *G40PΔN109* para abrir el sustrato sh2 (o sh8) de manera más que evidente con una polaridad 3'→5' (Figura 22 B y Figura 21), la opuesta a la descrita para *G40P* (Ayora *et al.*, 2002a) (Figura 22 A) y cualquier helicasa hexamérica del tipo DnaB .

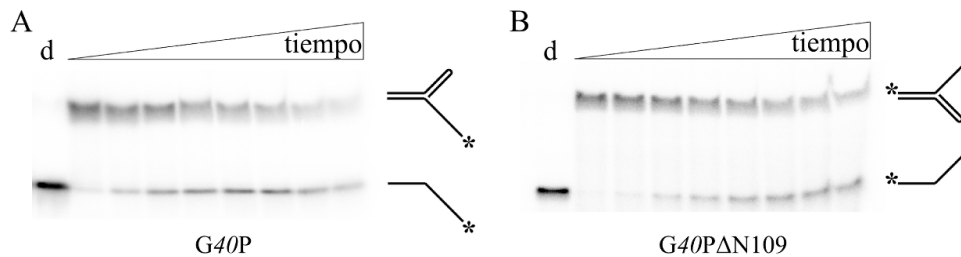


Figura 22. Geles de actividad helicasa.

A) *G40P* (1,3 nM; pH 7,0) separa con polaridad 5'→3' las cadenas de un sustrato (sh1) que presenta un brazo de ADNcs con un extremo libre 5'. **B)** *G40PΔN109* (132 nM; pH 6,5) es capaz de separar con polaridad 3'→5' las dos hebras de un sustrato (sh2) cuyo brazo de ADNcs tiene un extremo 3' libre. Los tiempos empleados fueron: 0, 2, 5, 7, 10, 12, 15 y 17 minutos; d indica el control con el sustrato totalmente separado en sus dos cadenas constituyentes; el asterisco muestra el extremo 5' que contiene la marca radiactiva.

Otra particularidad reseñable sería la capacidad de *G40P* para separar las cadenas de los sustratos sh2, sh8 y sh6, si bien esta tiene lugar con unos valores muy bajos de actividad. El hecho de que *G40P* pueda actuar sobre el sustrato sh6 indicaría que tal actividad residual está vinculada con su capacidad para unir ADNcd (con mucha menor afinidad que con respecto a ADNcs). Igualmente, dado que *G40PΔN109* no presenta actividad sobre este sustrato sh6, la actividad helicasa que es capaz de desarrollar en los distintos sustratos no se debe a la unión a ADNcd y debe atribuirse a su unión a un brazo de ADNcs.

Con el fin de poder comparar la polaridad de las actividades helicásicas de *G40P* y *G40PΔN109* se llevaron a cabo experimentos en los que se evaluó la evolución de la actividad a lo largo del tiempo a dos valores de pH (Figura 23 y Figura 24).

A pH 7,0 G40P es capaz de separar las cadenas de los sustratos sh0 y sh1 empleando una actividad helicasa canónica con polaridad 5'→3' (Figura 23). Únicamente es capaz de mostrar una actividad marginal con el sustrato sh2, que en principio requeriría una polaridad 3'→5'. La actividad helicasa con el sustrato sh1 es sorprendentemente mucho más alta que con el sustrato sh0 (se precisarían 20 veces más cantidad de enzima para alcanzar valores similares de actividad). Este resultado ha sido descrito previamente para DnaB de *Thermus aquaticus* (Kaplan, 2000) y se relaciona con el efecto que tiene el brazo 3' del sustrato sobre la actividad de la helicasa. Dicho brazo supondría un obstáculo físico que o bien queda fuera del canal central de la helicasa hexamérica o bien se fuerza a pasar por el interior del anillo que esta constituye. Bajo esta asunción, un brazo de cadena doble ofrecería una mayor resistencia a pasar por el canal central y estimularía la actividad helicasa. Por el contrario, con un brazo de cadena sencilla cabe la posibilidad de que este pase más fácilmente por el canal central, lo que supondría que no produzca separación de cadenas y que la actividad helicasa sea menor que óptima.

G40PΔN109 en condiciones de pH 7,0 despliega una actividad helicasa mucho menor que G40P (Figura 23), incluso a altas concentraciones de proteína (en estos ensayos se empleó 5 veces mas cantidad del mutante que de G40P). En cualquier caso, presentó una ligeramente mayor actividad con el sustrato sh1 (que requiere polaridad 5'→3') que con el sustrato sh2, siendo el sustrato sh0 el que menos actividad helicasa experimentó. Esto último coincidiría con

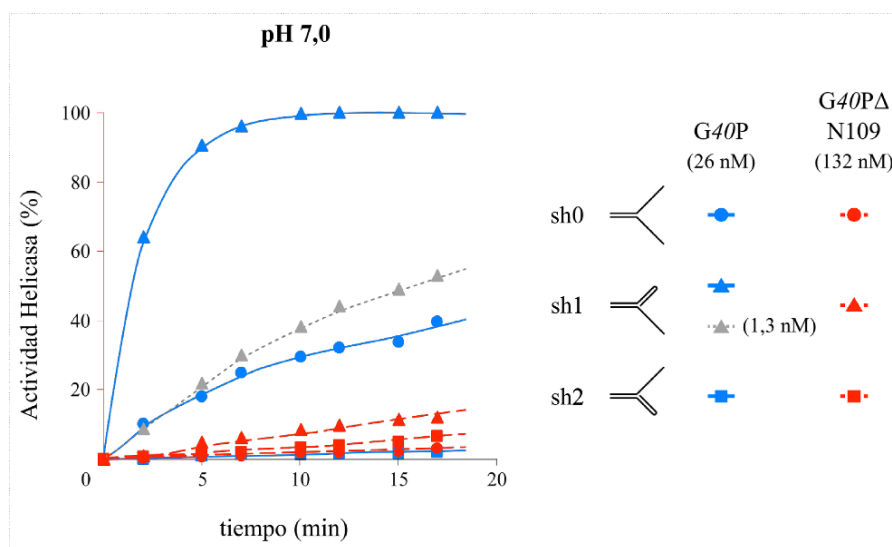


Figura 23. Actividad helicasa de G40P y G40PΔN109 a pH 7,0.

Tanto los sustratos como la concentraciones de proteína empleados en los experimentos quedan reflejados en la leyenda de la figura.

Resultados

lo anteriormente comentado sobre el efecto de los brazos de cadena doble (ahora 3' ó 5' según el sustrato).

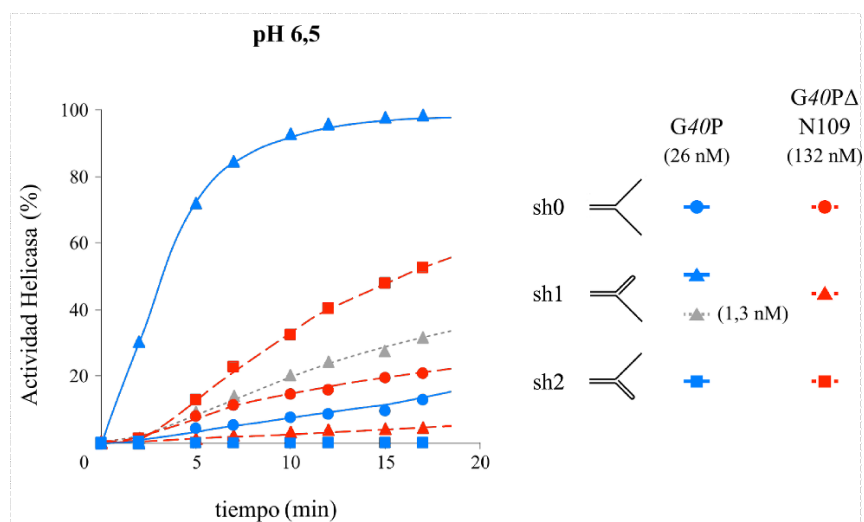


Figura 24. Actividad helicasa de G40P y G40PAN109 a pH 6,5.

Tanto los sustratos como las concentraciones de proteína empleados en los experimentos quedan reflejados en la leyenda de la figura.

A pH 6,5 la actividad helicasa de G40P disminuye de manera evidente con todos los sustratos, si bien sigue siendo el sustrato sh1 el que mayor actividad experimenta (Figura 24). En el caso de G40PAN109 se produjo una fuerte estimulación de la actividad helicasa, sobre todo con el sustrato sh2 (que requiere polaridad 3'→5'). La actividad helicasa con el sustrato sh0 resultó ser mayor que la de G40P (pero recordemos que se emplearon 5 veces más cantidad de enzima) y la correspondiente actividad con el sustrato sh1 se vio disminuida con respecto a lo obtenido a pH 7,0. Si se compara el transcurso de la actividad de G40P a pH 7,0 (Figura 23) con el de G40PAN109 a pH 6,5 (Figura 24) se aprecia un cierto retraso de unos 2 minutos en el inicio de la actividad helicasa para este último, que en parte podría justificarse por su menor afinidad por el sustrato o su menor estabilidad.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se decidió estudiar como evolucionaba la actividad helicasa de ambas proteínas dependiendo del pH del medio en el que se encontraban (Figura 25). Como puede observarse existe una clara diferencia de comportamiento en la actividad helicasa de ambas proteínas. Mientras que *G40P* presenta dos picos de actividad máxima a pH 7,0 y a pH 6,2 y una atenuación de la actividad en el rango de pH de 6,5 a 6,8 con todos los sustratos, *G40PΔN109* muestra un único pico de actividad centrado en pH 6,5 con los sustratos sh2 y sh0 y el comportamiento característico de *G40P* con el sustrato sh1 (si bien la actividad es considerablemente menor). Considerando esto, aparentemente el máximo de la actividad helicasa de *G40PΔN109* con polaridad 3'→5' parece coincidir con los mínimos de la actividad helicasa con polaridad 5'→3' de las dos proteínas, lo que podría interpretarse como

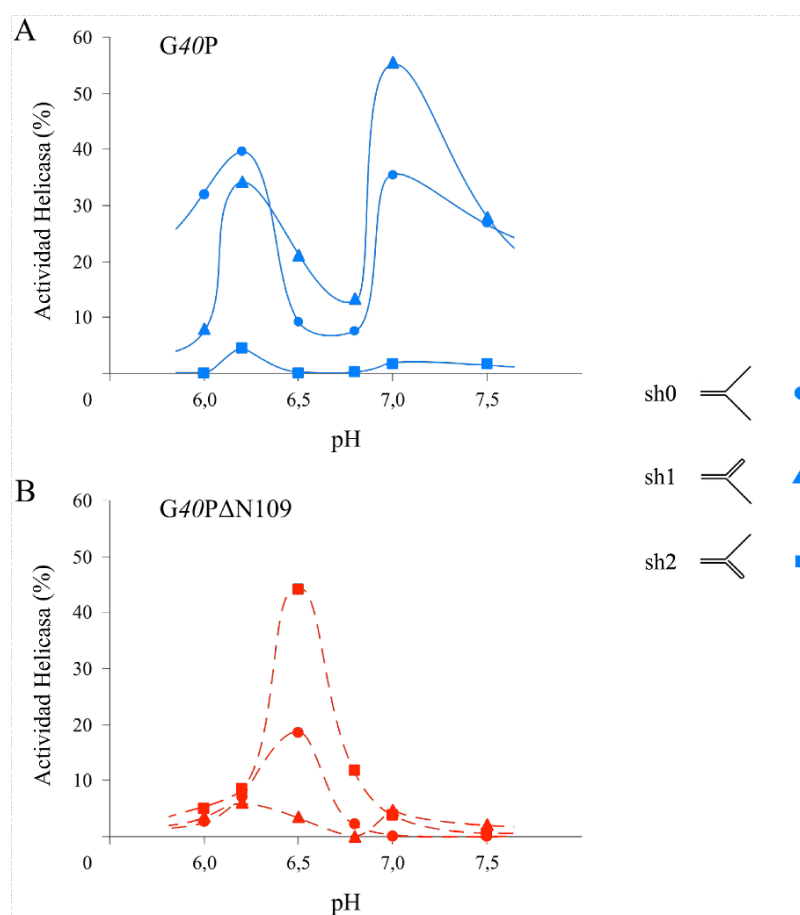


Figura 25. Efecto del pH en la actividad helicasa de *G40P* y *G40PΔN109*.

Los ensayos helicasa se realizaron a seis distintos valores de pH con los sustratos indicados en presencia de *G40P* (A; 26 nM con los sustratos sh0 y sh2; 1,3 nM con sh1) o *G40PΔN109* (B; 132 nM; concentraciones expresadas como hexámeros).

Resultados

que el mecanismo que permite una polaridad excluye a la otra y viceversa.

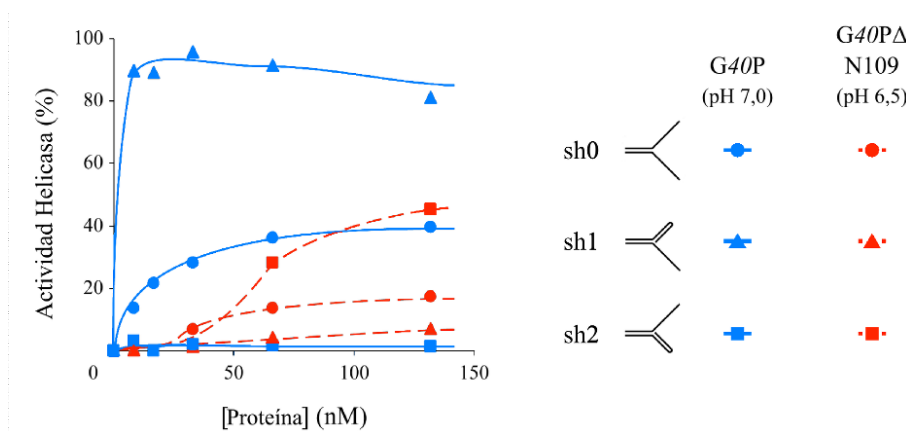


Figura 26. Actividad helicasa a distintas concentraciones de G40P y G40PDN109.

Las principales especificaciones de las reacciones realizadas (37°C durante 15 minutos) quedan recogidas en la leyenda de la figura.

El estudio de la dependencia de la actividad helicasa con respecto a la concentración de ambas proteínas reveló que, si bien G40P presentaba un óptimo de actividad para concentraciones en torno a 26 nM (por encima de ese valor las reacciones tendían a saturarse), G40PDN109 precisaba indiscutiblemente mayores concentraciones de proteína, presentando un comportamiento característico que hacía que a bajas concentraciones (por debajo de 50 nM) hubiese una caída abrupta de la actividad.

Finalmente, puesto que anteriormente se había determinado que la actividad ATPasa de

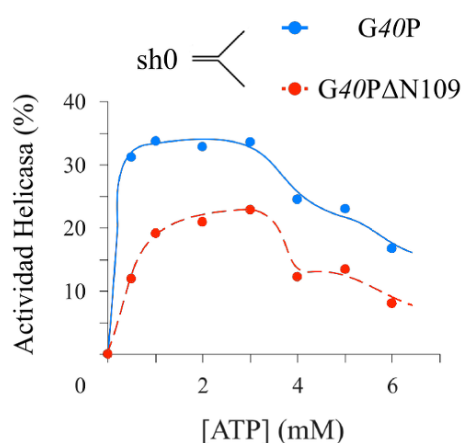


Figura 27. Inhibición de la actividad helicasa a altas concentraciones de ATP.

Las reacciones se llevaron a cabo con el sustrato sh0 y G40P (26 nM) o G40PDN109 (132 nM).

ambas proteínas sufría de inhibición por sustrato, se decidió analizar cual era el comportamiento de la actividad helicasa de ambas proteínas a distintas concentraciones de ATP (Figura 27). Tanto G40P como G40PΔN109 experimentan una disminución de la actividad helicasa a medida que la concentración de ATP aumenta por encima de un valor de 3 mM, demostrándose que la saturación de la proteína con ATP tiene un efecto deletéreo no solo en la actividad ATPasa sino también en la actividad helicasa, que obviamente depende de la anterior.

4.4.6 Estudio estructural por microscopía electrónica de G40PΔN109 y G40P.

Con el fin de poder obtener información estructural comparativa de G40P y G40PΔN109 se estableció una colaboración con el laboratorio del Prof. José María Carazo, proporcionándose tanto proteína (G40P, G40PΔN109 y G39P) como plásmidos de expresión. Se obtuvieron así reconstrucciones tridimensionales de ambas proteínas (Núñez-Ramírez *et al.*, 2006), aunque aquí nos centraremos en la clasificación en poblaciones de simetría del conjunto de partículas analizadas que se llevó a cabo (Figura 28). Previamente ya se había determinado que la inspección por microscopía electrónica de proteínas del tipo DnaB permitía identificar distintas conformaciones en las imágenes proyectadas (Yu *et al.*, 1996b; Yang *et al.*, 2002; Bárcena *et al.*, 1998; Fouts *et al.*, 1999; Scherzinger *et al.*, 1997), lo que facilitaba su clasificación en tres distintos grupos según los componentes de simetría rotacional que presentaban: C_3 (simetría rotacional de orden 3), C_6 (orden 6) y C_3C_6 (estado intermedio que muestra una mezcla de ambos tipos de simetría). Cuando muestras de G40P se incubaron a pH 6,5 se obtuvo una distribución de partículas en los tres grupos de simetría, siendo el mas representado el de simetría intermedia C_3C_6 (con un 50 % del total de vistas frontales), repartiéndose equitativamente el resto en los otros dos tipos de simetría (C_3 y C_6 , cada uno con un 25 %). En el caso de G40PΔN109 a pH 6,5 se obtenía también representación en los tres grupos, aunque el mayoritario resultaba ser el de simetría C_6 (con un 50 %; C_3 y C_3C_6 presentaban cada uno en torno al 25 % de las partículas analizadas). De hecho la población intermedia C_3C_6 , en este caso, no se diferenciaba mucho de la población C_6 (Figura 28, la componente de rotación de orden 3 tiene un valor muy bajo, con respecto al caso de G40P). Cuando la proteína G40P se incubó a pH 7,5 se producía un ligero descenso en la representatividad del grupo mayoritario, que seguía siendo el de simetría C_3C_6 (40 %), acompañado de un crecimiento en igual cuantía del grupo de simetría C_6 (35 %), mientras se mantenía el porcentaje para el grupo de simetría C_3 (25 %). Al incubarse G40PΔN109 a pH 7,5, únicamente aparecían dos grupos de simetría, uno C_6 (60 %) y otro C_7 (40 %), que sorprendentemente se correspondía con la presencia de 7 subunidades en el anillo formado por

Resultados

el mutante. Finalmente, a pH 7,0 *G40P* mantenía sus tres grupos de simetría, mientras que *G40PΔN109* únicamente presentaba miembros del grupo C_6 .

Así, la ausencia del dominio amino terminal en *G40PΔN109*, al menos en las muestras visualizadas por microscopía electrónica, produciría un desplazamiento hacia una mayor representatividad de la simetría C_6 e incluso la aparición de complejos con 7 subunidades. Además, también se puede apreciar en el caso del mutante *G40PΔN109* un estrechamiento en el canal central con respecto a las imágenes medias bidimensionales de *G40P*.

A parte de este estudio de las distintas conformaciones detectadas también se llevaron a cabo reconstrucciones 3D de ambas proteínas y se procedió a la localización del dominio amino terminal de *G40P* (Núñez-Ramírez *et al.*, 2006).

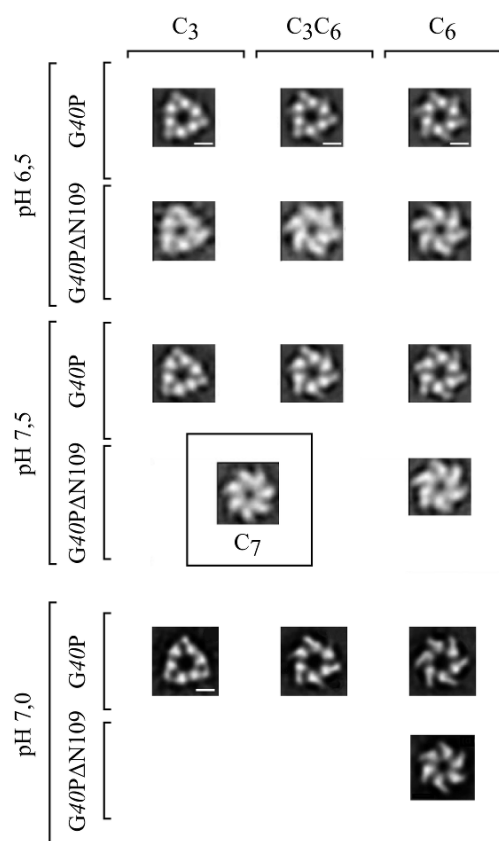


Figura 28. Polimorfismo cuaternario de *G40P* y *G40PΔN109*.

Imágenes de medias 2D de los oligómeros de ambas proteínas clasificadas por el valor del pH de incubación (6,5 , 7,0 y 7,5) y su simetría rotacional (C_3 , C_3C_6 , C_6 y C_7). Las barras blancas representan 5 nm.

4.5 Efecto de G39P en la actividad helicasa de G40P.

4.5.1 Efecto de G39P en la actividad helicasa de G40P y G40PΔN109.

Previamente se había determinado que G39P inhibía la actividad helicasa de G40P cuando se suministraba un sustrato de ADN circular de cadena sencilla (M13 mp18) hibridado con una pequeña cadena marcada (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999; Figura 1 A). Dado que ese sustrato empleado para determinar la actividad helicasa es mucho más complejo que los empleados en este trabajo, debido al propio tamaño de la molécula de ADN circular (7,249 nucleótidos) y a que este presenta estructura secundaria a lo largo de toda su extensión, se decidió probar el efecto de G39P en la actividad de G40P y G40PΔN109 empleando sustratos más pequeños y sencillos (Figura 21). Con ello se trató de eliminar los posibles efectos secundarios que las características del ADNcs de M13 pudieran estar introduciendo.

La actividad helicasa de G40P se ve estimulada en presencia de G39P (Figura 29 A) al emplearse el sustrato sh0 que presenta dos brazos de ADNcs. Sin embargo, la actividad helicasa de G40PΔN109 se ve inhibida fuertemente por G39P al emplearse ese mismo sustrato. Los mismos resultados para ambas proteínas se obtuvieron al emplear otros sustratos similares. G39P sola no tiene ningún efecto en el sustrato empleado (Figura 29). Atendiendo a estos resultados la interacción con G39P debe entorpecer de alguna manera la actividad helicasa del mutante, pero este hecho sirve para demostrar que la actividad helicasa detectada es debida

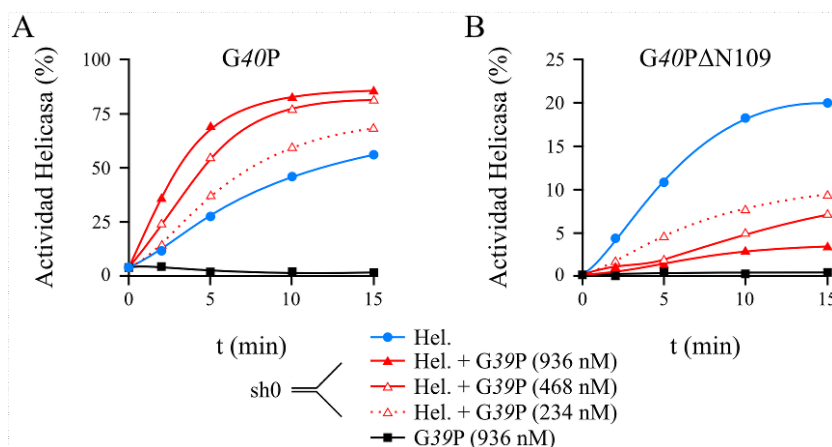


Figura 29. Efecto de G39P sobre la actividad helicasa de G40P y su mutante de delección.

Para los ensayos se empleó el sustrato sh0 (0,2 nM) en presencia de la proteína con actividad helicasa (Hel.), ya fuese G40P (A; 52 nM hexámero ó 312 nM como monómero; pH 7,0) o G40PΔN109 (B; 132nM hexámero ó 792 nM como monómero; pH 6,5), y distintas cantidades de G39P (0, 234, 468 y 936 nM).

estrictamente a G40PΔN109, ya que puede ser inhibida por una interacción específica con G39P y además el efecto es distinto al obtenido cuando G39P interacciona G40P.

4.5.2 Efecto de G39P sobre el cargado de G40P en ADNcd.

Puesto que previamente en los estudios de la polaridad de G40P y G40PΔN109 se había detectado que G40P podía presentar actividad helicasa derivada de su unión a ADN de cadena doble se decidió analizar como se veía afectada tal actividad en presencia de G39P, puesto que en principio el cargado de G40P mediado por G39P se debería hacer en ADN de cadena sencilla en las inmediaciones del origen de replicación (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999). Para ello se emplearon el sustrato sh2, sobre el que G40P no debería presentar actividad helicasa debido a su polaridad 5'→3', y el sustrato sh6 sobre el que tampoco debería presentar tal actividad pues no hay brazos de ADN de cadena sencilla en los que acoplarse. Sin embargo G40P es capaz de desarrollar actividad helicasa sobre estos dos tipos de sustratos, aunque con unos valores mucho menores que con los sustratos óptimos (Figura 21, Figura 23 y Figura 25). En paralelo se analizó también cuál era la actividad de G40PΔN109 sobre estos sustratos y cuál era el efecto de G39P.

G40PΔN109 es capaz de separar el sustrato de ADN sh2 dada su actividad helicasa de polaridad 3'→5', sin embargo en presencia de un exceso de G39P tal actividad queda totalmente inhibida (Figura 30 A), repitiéndose el resultado previamente mostrado (Figura 29). Cuando se emplea el sustrato sh6, G40PΔN109 no es capaz de desarrollar actividad helicasa (Figura 30 B). La proteína precisa de al menos un brazo de cadena sencilla, que sería el caso del sustrato sh2. En presencia de G39P, G40PΔN109 sigue siendo incapaz de actuar sobre el sustrato sh6. En claro contraste, G40P sí puede separar las cadenas de ambos sustratos, aunque en el sustrato sh2 la actividad es muy baja. En cualquier caso, dado que G40P puede separar las cadenas del sustrato sh6 de alguna manera es capaz de unirse a ADN de cadena doble y desplazarse albergando dicha doble cadena en su canal central. Lo llamativo del experimento resultó ser que tal actividad se veía inhibida en presencia de G39P, tanto con el sustrato sh2 como con el sh6 (Figura 30 D y Figura 30 E, respectivamente).

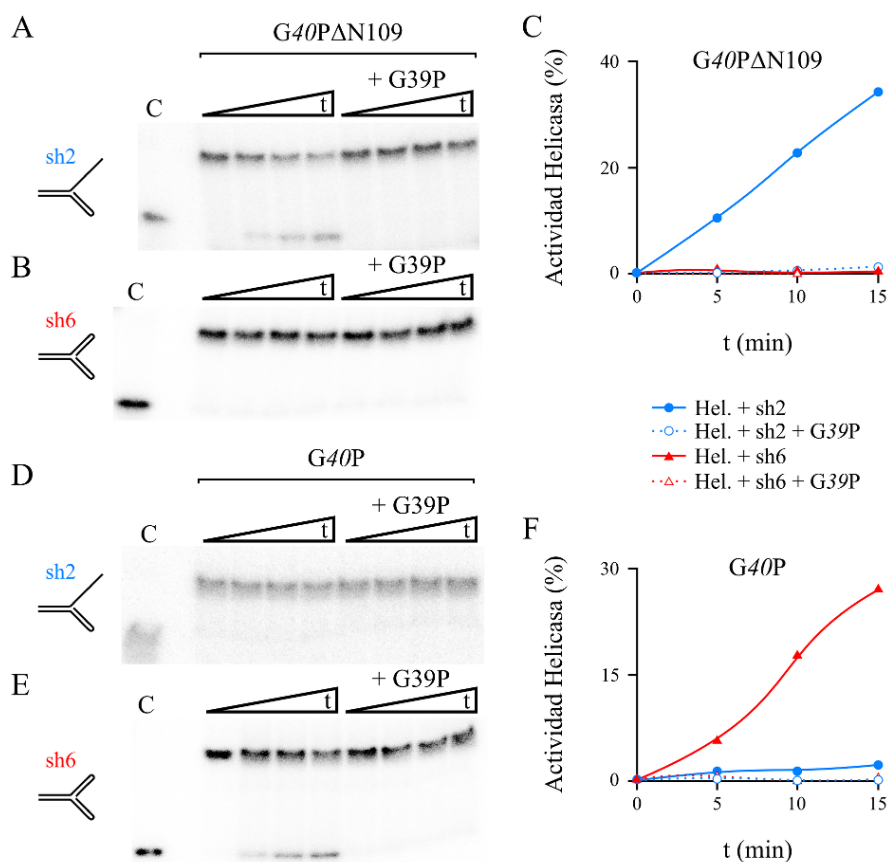


Figura 30. Efecto de G39P sobre el cargado de G40P en ADNcd.

En los ensayos se emplearon los sustratos de ADN sh2 y sh6 (0,2 nM) junto con la proteína G40P (52 nM hexámero; 312 nM monómero; pH 7,0) o G40PΔN109 (132 nM hexámero; 792 nM monómero; pH 6,5), en presencia o ausencia de G39P (936 nM monómero). C representa el control del sustrato hervido, muestra que indica la posición en el gel de la cadena marcada libre. Los tiempos empleados fueron 0, 5, 10 y 15 minutos.

Con el fin de ahondar más en las características de este comportamiento de G40P y ver cómo lo inhibe G39P se emplearon otros cuatro sustratos distintos (Figura 31). En estos sustratos los brazos de cadena sencilla se encuentran separados de la cadena marcada, cuya liberación se sigue en los geles, por un tramo de cadena doble. G40P es capaz de separar la cadena marcada del ADN inicial en todos los sustratos, pero puesto que G40P presenta actividad helicasa con polaridad 5'→3', solo debería poder hacerlo en los sustratos sh11 y sh24, que son los únicos que presentan brazos de ADNcs compatibles para el desarrollo de tal actividad (se precisaría brazo de cadena sencilla con un extremo 5' libre). Sin embargo, también presenta actividad en los sustratos sh10 y sh25, que o bien solo presentan un brazo de cadena sencilla con un extremo 3' libre o directamente no tienen cadena sencilla disponible. En estos dos últimos casos la actividad se inhibe totalmente en presencia de G39P, quedando de

Resultados

manifiesto entonces que es por la unión a cadena doble que *G40P* presenta actividad en dichos sustratos. De igual manera, *G39P* disminuye la actividad helicasa de *G40P* cuando se emplea el sustrato sh24, lo que indicaría que parte de la actividad exhibida se debe al cargado en las zonas de cadena doble. El hecho de que aún haya actividad con el sustrato sh24 también indicaría que *G39P* no inhibe el cargado de *G40P* en un sustrato con un único brazo de cadena sencilla. Bajo estas circunstancias *G40P* separaría la cadena marcada haciendo pasar la zona previa de cadena doble por el interior de su canal. Cuando se emplea un sustrato con dos brazos de cadena sencilla, sh11, *G39P* estimula la separación parcial de la cadena marcada, dado que favorece la separación total de la cadena a la que se une inicialmente (la que contiene el brazo de cadena sencilla con el extremo 5' libre). Puesto que en este caso *G40P* se desplazaría por una única cadena, y no una cadena doble como en los otros casos, al liberar con su actividad helicasa la cadena en la que se carga la proteína se separa del resto del sustrato y la cadena marcada no puede ser separada del producto parcial generado (Figura 31). Cuando no está presente *G39P*, *G40P* sí que puede separar totalmente la cadena marcada, ya sea por la unión a las zonas de cadena doble o por forzar la entrada del otro brazo de cadena sencilla en su canal central (Kaplan, 2000), lo que la mantendría unida al sustrato hasta la liberación completa de la cadena marcada. *G39P* parecería poder inhibir esta última posibilidad, lo que podría explicar en gran medida la estimulación que experimenta la actividad helicasa de *G40P* con un sustrato con dos brazos de cadena sencilla (Figura 29 A).

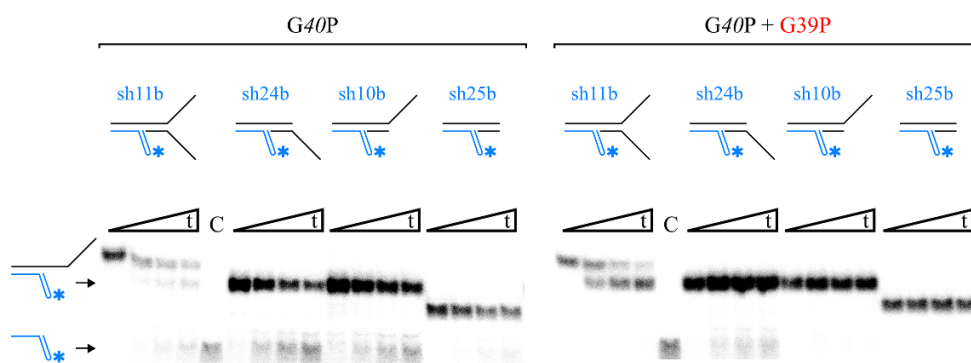


Figura 31. *G39P* inhibe la actividad helicasa de *G40P* derivada de la unión a ADNcd.

Los sustratos indicados se incubaron con *G40P* (52 nM hexámero; 312 nM monómero; pH 7,0), durante distintos tiempos (0, 5, 10 y 15 minutos), en presencia o ausencia de *G39P* (936 nM monómero). En las calles indicadas con C se cargó el ADNcs marcado, común a todos los sustratos. Se señala la altura a la que corren los productos de la reacción y se emplea un asterisco para indicar la cadena marcada.

4.6 Apareamiento de cadenas complementarias de ADN y G40PΔN109.

4.6.1 G40PΔN109 promueve la hibridación de cadenas de ADN.

Tras la caracterización del insospechado comportamiento de G40PΔN109 como helicasa con polaridad 3'→5' otra sorpresa referida a este mutante aguardaba aún. Cuando se incubaba la proteína en presencia de cadenas complementarias de ADN no hibridadas, G40PΔN109 era capaz de emparejarlas a una velocidad mayor a la que lo harían en su ausencia (Figura 32).

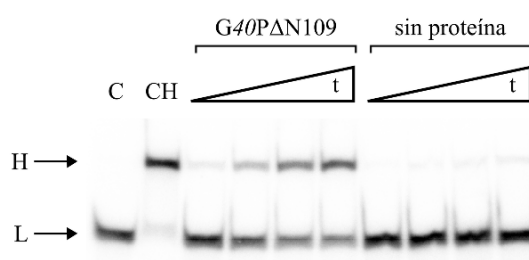


Figura 32. G40PΔN109 acelera la hibridación de cadenas de ADN complementarias.

Las cadenas sencillas no apareadas del sustrato sh0 se incubaron en ausencia o presencia de G40PΔN109 (109 nM como hexámero, 654 como monómero; pH 7,5). Como controles se emplearon las muestras C (muestra inicial con las cadenas separadas) y CH (control de hibridación). Se muestra la altura a la que se separan en el gel la cadena marcada libre (L) y el producto hibridado (H). Los tiempos empleados fueron 2, 5, 10 y 15 minutos.

Puesto que esta es precisamente la actividad opuesta a la única actividad que se esperaba que desarrollase, la actividad helicasa, se decidió analizar el comportamiento de G40PΔN109 utilizando el sustrato sh0, que en principio puede ser usado por ambas actividades.

4.6.2 Inhibición de la actividad de hibridación de G40PΔN109.

Al ser esta una actividad totalmente inesperada se decidió investigar si había alguna manera de afectarla específicamente de forma que se pudiese atribuir sin ninguna sospecha a G40PΔN109. En este sentido, la mejor opción era probar el efecto de la acción de G39P sobre la actividad de hibridación de G40PΔN109. Con el fin de optimizar la unión de G39P y G40PΔN109 se añadió 1 mM de ATP, puesto que la presencia del ribonucleótido favorece la interacción entre G39P y G40P (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999). Se pudo comprobar así que G39P inhibe la actividad de hibridación de cadenas de ADN, si bien se precisan concentraciones relativamente elevadas de la proteína (Figura 33 A). G39P, por sí sola, no tiene ningún efecto sobre los sustratos de helicasa, pero sí que es capaz de inhibir la actividad helicasa de

G40PΔN109 (Figura 29). Por lo tanto al emplearse un sustrato de ADN del tipo de sh0, con dos brazos de cadena sencilla, ambas actividades se verían inhibidas en presencia de G39P.

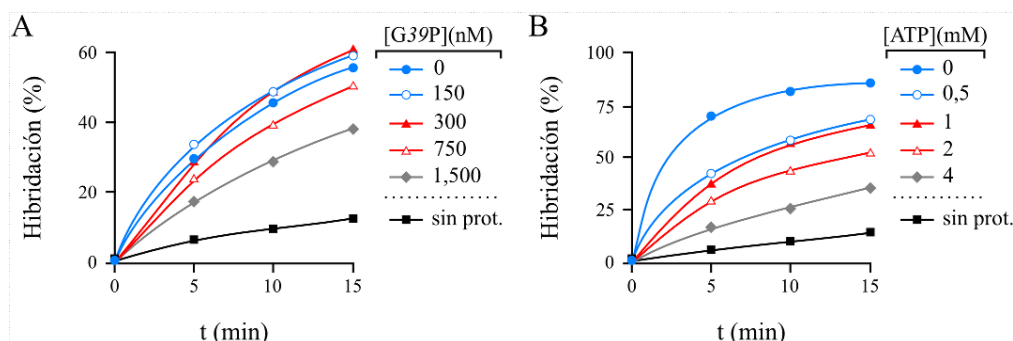


Figura 33. Efecto del ATP y G39P sobre la hibridación producida por G40PΔN109.

A) G39P inhibe la actividad de apareamiento de cadenas de G40PΔN109. La hibridación de las cadenas que constituyen el sustrato sh0 se analizó en reacciones que contenían G40PDN109 (109 nM como hexámero; 654 nM como monómero; pH 7,5) y distintas concentraciones de G39P (1,5 μM; 750 nM; 300 nM; 150 nM; concentraciones como monómero). B) Efecto de la concentración de ATP en la actividad de hibridación de G40PΔN109 (109 nM; pH 7,5). Los datos “sin prot.” se refieren a reacciones en las que no se añadió G40PΔN109.

Al haberse añadido a las reacciones ATP, para promover la interacción entre G40PΔN109 y G39P, se decidió examinar cuál era el efecto de este en ausencia de G39P. Se pudo establecer que la capacidad de G40PΔN109 para aparear cadenas de ADN complementarias podía ser inhibida en presencia de ATP (Figura 33 B). Sin embargo, para los valores de concentración de ATP empleados en los ensayos previos de actividad helicasa, 1 mM, G40PΔN109 aún conservaba actividad de apareamiento de cadenas, por lo que en dichos ensayos anteriores ambas actividades coexistían. De hecho hay que tener en cuenta que en estos ensayos de apareamiento de cadenas puede estar actuando la actividad helicasa de G40PΔN109, aunque esta se inhibe a valores altos de ATP (Figura 27; a 4 mM ATP se reduce a la mitad).

4.6.3 Comparación entre las actividades de RecA y G40PΔN109.

Esta actividad, que resulta ser la inversa a la actividad helicasa exhibida por G40P, es característica de proteínas implicadas en el proceso de recombinación, como RecA, si bien en ésta tal actividad se da en el contexto de mecanismos más complejos como es el de intercambio de cadenas (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Bell, 2005; Cox, 2007). Con esto en mente, se llevó a cabo un ensayo en el que se comparaba la actividad de RecA de *Escherichia coli* con la de G40PΔN109 (Figura 34). Como puede observarse, una menor cantidad de RecA (2,5 veces menos) resultó ser más activa que G40PΔN109. Igualmente, mientras que la actividad de

G40PΔN109 se inhibía en presencia de ATP, la de *RecA* se estimulaba. Como ya se ha mostrado anteriormente, la actividad de hibridación de *G40PΔN109* se inhibió fuertemente ante un exceso de *G39P* en presencia de ATP (Figura 34 B).

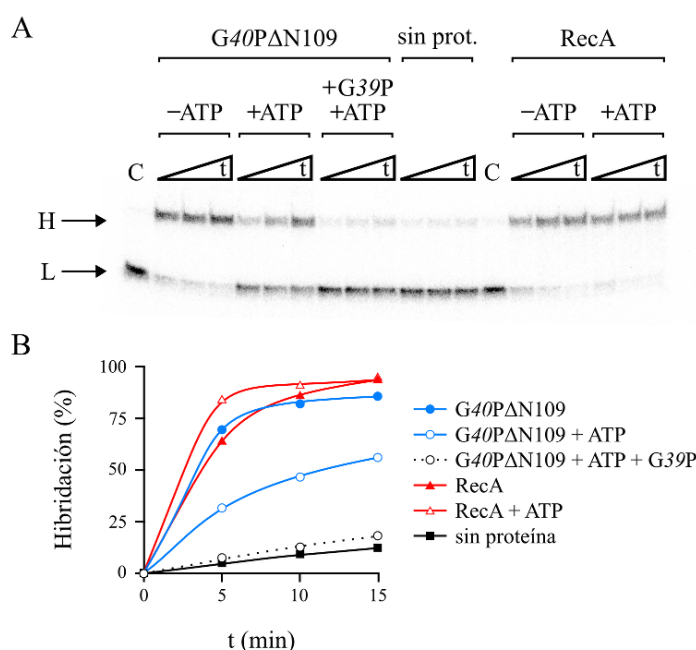


Figura 34. Comparación de las actividades de *RecA* y *G40PΔN109*.

A) Gel en el que se compara la actividad de *G40PΔN109* con la de *RecA* (ver Figura 32). B) Cuantificación de las reacciones de hibridación de cadenas complementarias. Las cadenas de ADN libres, no hibridadas, del sustrato sh0 se incubaron los tiempos indicados con *G40PΔN109* (654 nM) o *RecA* (264 nM), en presencia o ausencia de 1 mM ATP. También se incluyen reacciones de *G40PΔN109* con *G39P* (3 μM) y ATP (1 mM) y reacciones de apareamiento espontaneo de las cadenas (sin proteína). Todas las reacciones se llevaron a cabo en condiciones de pH 7,5.

4.6.4 Comparación de la actividad de hibridación de *G40PΔN109* y *G40P*.

A tenor de los resultados obtenidos, se decidió investigar qué comportamiento presentaba *G40P* en reacciones en las que *G40PΔN109* era capaz de desplegar su actividad de apareamiento de cadenas. Puesto que *G40P* presenta su actividad helicasa intacta, para estos ensayos se resolvió emplear un sustrato parcialmente hibridado, ya que permitiría analizar tanto la actividad de apareamiento de cadenas como la de separación de cadenas (Figura 35). Con un sustrato inicial hibridado al 50 % *G40PΔN109* exhibió un comportamiento similar al visto anteriormente, su máxima actividad se alcanzó en ausencia de ATP, disminuyó cuando este estaba presente y se anuló prácticamente en presencia de *G39P* y ATP. *G40P*, por su parte, no presentó ningún tipo de actividad en ausencia de ATP, y claramente fue capaz de separar las

Resultados

cadenas del sustrato parcialmente hibridado mediante su actividad helicasa. Por lo tanto, esta actividad de hibridación de cadenas sencillas de ADN complementarias presente en G40PΔN109 está totalmente inhabilitada en G40P, por un mecanismo en el que juega algún papel regulador su dominio amino terminal.

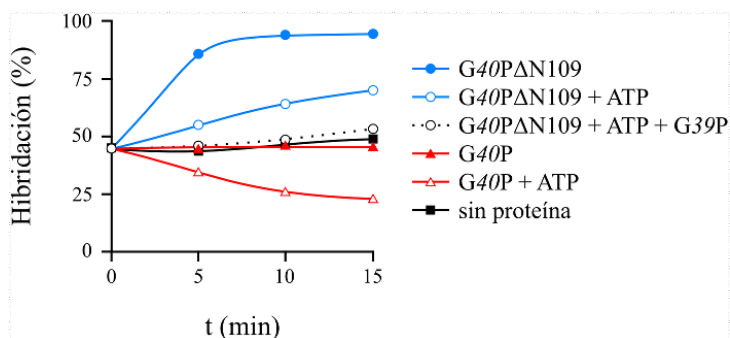


Figura 35. Comparación de las actividades de G40P y G40PΔN109.

En estos se ensayos se empleó un sustrato sh0 hibridado parcialmente (aproximadamente al 50 %) para poder evaluar tanto la actividad helicasa como la actividad de hibridación de cadenas. Tal sustrato (0,2 nM) se incubó con G40PΔN109 (109 nM como hexámero, 654 nM como monómero) o con G40P (19 nM como hexámero, 114 nM como monómero) los tiempos indicados. Según lo indicado, en algunas de las reacciones se añadió G39P (3 μM monómero) y/o ATP (1 mM).

4.6.5 Dependencia del pH de la actividad de hibridación de G40PΔN109.

Puesto que la actividad helicasa neta de G40PΔN109 variaba según el pH de la reacción en la que se medía (Figura 25), se decidió analizar el efecto que el pH ejercía en el balance entre la actividad de hibridación de G40PΔN109 y su actividad helicasa, por lo tanto en presencia de ATP. Cuando se empleó un sustrato totalmente desapareado, se pudo constatar que la actividad de hibridación disminuía a medida que descendía el valor del pH de la solución de reacción (Figura 36 A). Recordemos que G40PΔN109 presenta su valor máximo de actividad helicasa a un pH de 6,5 unidades (Figura 24 y Figura 25). Para realizar el experimento en unas condiciones más favorables a la actividad helicasa, pero permitiendo a la vez que pudiese producirse hibridación de cadenas, se empleó un sustrato hibridado al 70 % (Figura 36 B). Bajo tales condiciones se pudo apreciar el equilibrio que se establece entre las actividades de separación e hibridación de cadenas de ADN, aunque los valores de estas eran muy bajos ya que las condiciones de sustrato inicial disponible estaban lejos de ser las óptimas. En cualquier caso se pudo apreciar que a medida que disminuye el pH aumenta la actividad helicasa y a medida que aumenta el pH se impone la actividad de apareamiento de cadenas. Esto pone de manifiesto que para valores de pH por encima de 7,0 la actividad de hibridación de cadenas de

G40PΔN109 enmascara su actividad helicasa, y lo hace parcialmente para valores por debajo de ese valor.

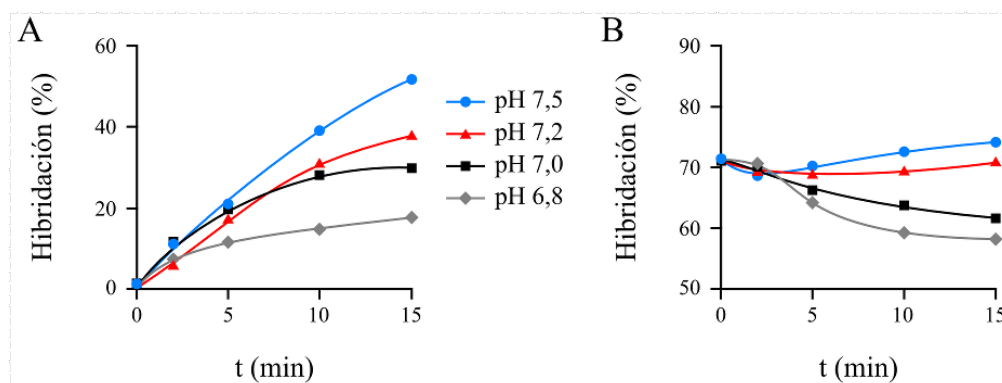


Figura 36. Hibridación y actividad helicasa de G40PΔN109 según el pH.

Las cadenas sencillas del sustrato sh0, en distintos porcentajes de hibridación (0 % en **A** y 70 % en **B**), se incubaron durante los tiempos indicados con G40PΔN109 (109 nM hexámero), en presencia de ATP, en soluciones de reacción con distintos valores de pH.

Sin embargo, en ausencia de ATP, G40PΔN109 mantiene su capacidad para hibridar cadenas de ADN complementarias en un rango de pH de 6,5 a 7,5 (Figura 37). Por encima de esos valores de pH sí que se produce una disminución de dicha actividad.

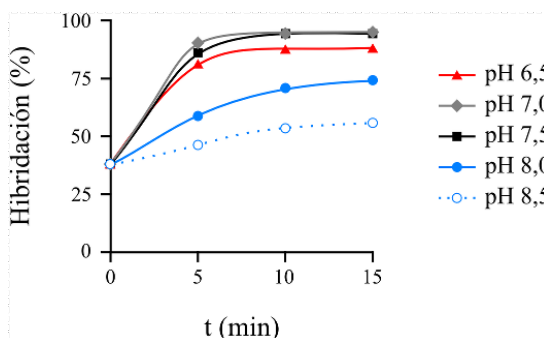


Figura 37. Actividad de hibridación de G40PΔN109 a distintos valores de pH en ausencia de ATP.

El sustrato sh0 (40 % apareado) se incubó con G40PΔN109 (109 nM hexámero), sin añadir ATP y bajo distintas condiciones de pH.

4.6.6 G40PΔN109 puede alojar dos cadenas de ADN en su canal central.

Trabajos anteriores habían demostrado que las proteínas DnaB de *Thermus aquaticus* y de *E. coli* eran capaces de desplazarse haciendo pasar dos cadenas de ADN por su canal central, ya fueran estas complementarias o no (Kaplan, 2000; Kaplan y O'Donnell, 2002). Teniendo esos resultados en mente, se decidió verificar si G40P (ya se ha mostrado previamente, Figura 31) y, más importante, G40PΔN109 eran capaces de comportarse de la misma manera. En este sentido, el hecho de que G40PΔN109 pudiese albergar simultáneamente dos cadenas de ADN en su canal central podría usarse como mecanismo para hibridar cadenas complementarias de forma pasiva.

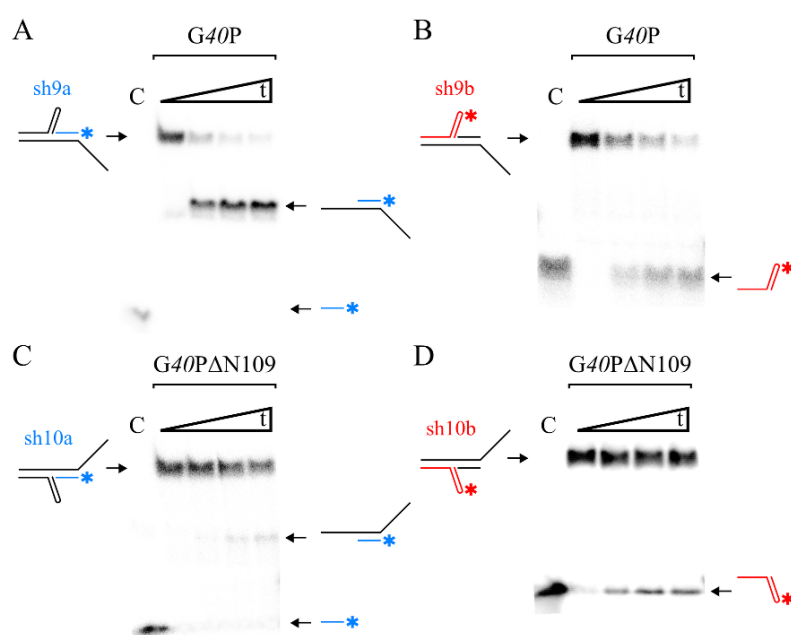


Figura 38. G40P y G40PΔN109 son capaces de englobar dos cadenas de ADN en su canal central.

En los ensayos se emplearon los sustratos de ADN (0,2 nM) indicados en la figura y las proteínas G40P (52 nM, pH 7,0) y G40PΔN109 (132nM, pH 6,5). Los tiempos empleados son 0, 5, 10 15 minutos; la muestra C contenía sustrato desapareado por calor, mostrándose la posición en el gel que ocupa la cadena de ADN marcada. Se indican en los geles las posiciones de los sustratos (izquierda de cada gel) y de los productos marcados separados por la actividad helicasa (derecha de cada gel). Los asteriscos señalan la cadena marcada en cada caso.

Para chequear tal capacidad se emplearon unos sustrato especiales, derivados de los previamente empleados (Figura 21), que tienen la particularidad de que para que la actividad helicasa pueda separar del sustrato inicial una de las hebra marcadas, una porción de dicho sustrato que es de cadena doble debe pasar por el canal central del hexámero (Figura 38; Figura 31). De esta manera se analizó la actividad de G40P con un sustrato que presentaba un brazo 5'

de ADNcs y la de G40PAN109 con el correspondiente sustrato que presentaba un brazo 3' de ADNcs, sustratos que aprovechan la polaridad óptima de cada proteína. G40P es capaz de separar la cadena marcada del sustrato sh9 (Figura 38 B) y lo hace sin llegar a separar la hebra que constituye la sección de cadena doble adyacente al brazo de cadena sencilla donde la proteína se carga y que se interpone entre este último y la cadena que sí que es capaz de separar (Figura 38 A). G40PAN109 despliega el mismo comportamiento frente al sustrato sh10 (Figura 38 C y D), es decir, es capaz de hacer pasar una porción de ADNcd por su canal central mientras prosigue su movimiento desde el brazo de cadena sencilla donde se une inicialmente.

4.7 Estudio del papel de G39P en el cargado de G40P.

Previamente se había determinado que la proteína G39P interaccionaba con G40P en presencia de ATP e inhibía su actividad ATPasa, proponiéndose para ella el papel de cargador de G40P en el origen de replicación del fago SPP1 (Pedré *et al.*, 1994; Ayora, Stasiak y Alonso, 1999). A continuación se describe el trabajo llevado a cabo con G39P, con el que se pretendía ahondar en la comprensión del mecanismo de interacción con la helicasa G40P y el proceso de liberación de esta última en el ADNcs de una horquilla de replicación.

4.7.1 Estructura de G39P.

Tratando de obtener información estructural de G39P y de G40P se inició una colaboración con el laboratorio de cristalografía de rayos-X del Dr. John B. Rafferty, que se consumó con la determinación de la estructura de G39P (Bailey *et al.*, 2003a; Bailey *et al.*, 2003b). A tal fin se proporcionó a su grupo proteína purificada (G39P y G40P), plásmidos de expresión y se hicieron varias construcciones basadas en el gen 39 destinadas a mejorar el proceso de cristalización y la caracterización de G39P.

Los primeros intentos de cristalización con G39P permitieron la obtención de cristales, pero estos resultaron ser poco reproducibles y de relativamente baja resolución. Al detectarse que la proteína que se encontraba en los cristales estaba parcialmente degradada se realizó un análisis por espectrometría de masas, que determinó la existencia de varios cortes proteolíticos en la zona carboxilo terminal (Bailey *et al.*, 2003a). Con el fin de poder trabajar con una población homogénea de proteína se decidió hacer una nueva construcción del gen 39 que diera lugar a una proteína que incluyera solo los 112 primeros aminoácidos de G39P (126 aminoácidos), la proteína G39P112. Empleando esta proteína se obtuvieron cristales que difractaron a 2,4 Å, que permitieron resolver la estructura de G39P (Bailey *et al.*, 2003b). Para ello se utilizó el método MAD para resolver las fases, empleando un derivado SeMetG39P112, y el método de reemplazamiento molecular.

Únicamente se pudo determinar la estructura de los primeros 67 aminoácidos de G39P, el resto de la proteína se encontraba desordenado dentro del cristal (Figura 39 A y B). La unidad asimétrica está formada por tres monómeros del dominio amino terminal de G39P (Figura 39 C) y la repetición de esta dentro del cristal da lugar a una disposición en forma de hélice (Figura 39 D). Aparentemente la superficie de esta hélice estaría en su mayor parte cargada negativamente, con zonas sin carga o una ligera carga positiva en la zona interna de la hélice, que constituye una especie de canal (Figura 39 E y F).

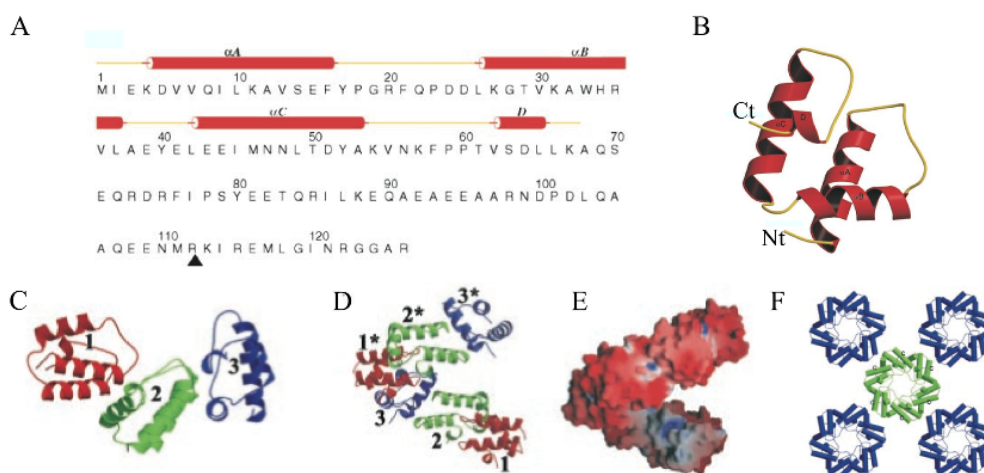


Figura 39. Estructura de G39P.

A) Secuencia de G39P con la superposición de la estructura determinada. **B)** Estructura del dominio amino terminal de G39P (se indican los extremos amino terminal, Nt, y carboxilo terminal, Ct). **C)** La unidad asimétrica está constituida por tres monómeros de G39P. **D)** Vista lateral mostrando la disposición en forma de escalera de espiral de seis monómeros de G39P. **E)** Misma vista que en (D) pero mostrando el potencial electrostático de superficie. **F)** Empaquetamiento de cinco hélices, como la mostrada en (E), contiguas.

Con el fin de contrastar los datos obtenidos por la resolución de la estructura de G39P, se aplicaron otros métodos (Bailey *et al.*, 2003b). Experimentos de NMR confirmaron la división de la proteína en dos dominios, uno plegado, que podría mediar la interacción transitoria entre distintos monómeros, y otro flexible con una estructura no definida, que se correspondería con el dominio carboxilo terminal. Experimentos de ultracentrifugación analítica y de gel filtración confirmaron que la proteína en solución se encuentra en un equilibrio entre monómero y oligómeros, desplazado claramente hacia la forma monomérica (Bailey *et al.*, 2003b; Ayora, Stasiak y Alonso, 1999).

El análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de G39P con la herramienta PONDR (<http://pondr.com/>) (Garner *et al.*, 1999) (Obradovic *et al.*, 2003) proporcionó una predicción del grado de orden/desorden que coincidió perfectamente con los resultados previamente descritos (Figura 40). Según esta predicción la proteína contendría una parte plegada que abarcaría hasta el residuo 69 y el resto de la secuencia estaría intrínsecamente no ordenado (Dunker *et al.*, 2001).

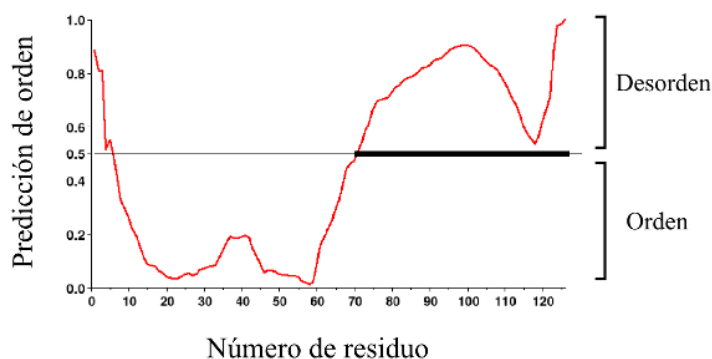


Figura 40. Predicción de orden/desorden de G39P.

La gráfica muestra una predicción del orden/desorden obtenida con el uso de la herramienta PONDR a partir de la secuencia de la proteína G39P.

4.7.2 Interacción de G40P con G39P.

Previamente a la caracterización de la estructura de G39P se habían generado distintas construcciones basadas en el gen 39 que daban lugar a proteínas con diferentes deleciones de la región amino terminal. Con la determinación de la estructura de G39P se añadieron otras construcciones a la colección, de manera que se consiguió acotar la zona de interacción entre G40P y G39P. Empleando ensayos de retención en resina de níquel se pudo comprobar que las distintas versiones de G39P eran capaces de interaccionar con G40P siempre y cuando mantuvieran la región carboxilo terminal de esta intacta (Figura 41 A). Por el contrario, las proteínas hΔ39C69 y Δ39C69h, que se corresponden con la parte ordenada cuya estructura se ha resuelto y por lo tanto carecen de la región carboxilo terminal, no fueron capaces de retener a G40P en la resina (Figura 41 A). Estas dos versiones de G39P alternaban la posición de la cola de histidinas en los extremos amino y carboxilo terminal con el fin de descartar que su presencia en uno de dichos extremos pudiese afectar a la unión con G40P. Utilizando el mismo tipo de ensayo se constató que G40P no podía interaccionar con h39I12, una versión de la proteína G39P112 (cuyos cristales sirvieron para resolver la estructura parcial de G39P) con una cola de histidinas en el extremo amino terminal (Figura 41 B). Se determinó de esta manera que los últimos 14 aminoácidos de G39P son esenciales para mantener la interacción con G40P. Igualmente se verificó que G40PΔN109 (que posee una cola de histidinas en el amino terminal) era capaz de retener en resina de níquel a la versión natural de G39P, pero no a G39P112 (Figura 41 C). Los resultados de interacción de G40P y G40PΔN109 con G39P se habían confirmado anteriormente mediante ensayos de gel filtración (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999) (y datos no mostrados). Estos resultados muestran que G39P interacciona mediante su región carboxilo terminal con G40P, sin que se precise el dominio amino terminal de esta última.

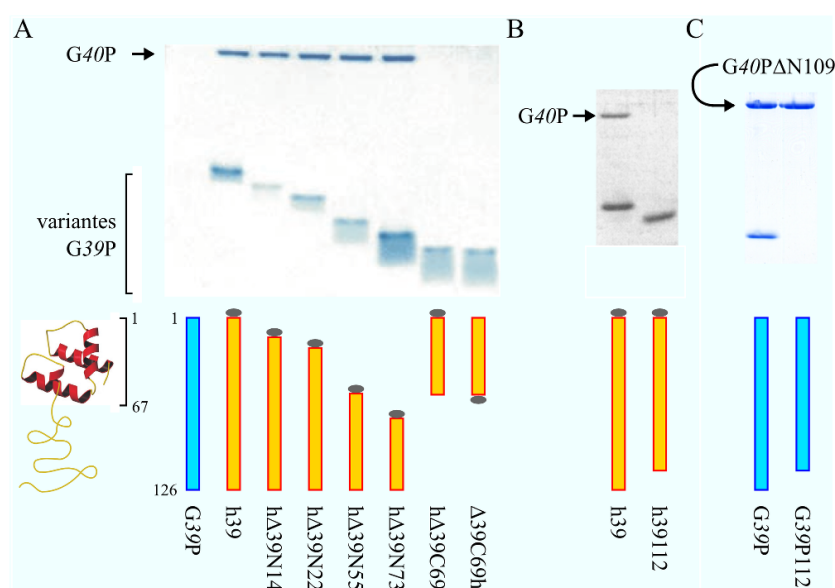


Figura 41. Interacción de G40P con G39P.

A) Se comprobó la retención de G40P en resina de Ni mediante la interacción con distintas versiones de G39P, todas ellas dotadas de una cola de histidinas. B) G40P no es retenido en resina de Ni cuando se emplea una versión de la proteína G39P112 con colas de histidinas (h39112). C) El mutante de delección G40PΔN109, que contiene una cola de histidinas en su extremo amino terminal, es capaz de retener G39P pero no G39P112. Se muestra en cada caso la elución de la resina a alta concentración de imidazol. Todas las reacciones se llevaron a cabo en presencia de 1 mM ATP y 5 mM MgCl₂.

El hecho de que G39112 no interaccione con G40P hace que no afecte a ni a su actividad ATPasa ni a su actividad helicasa (datos no mostrados). Ensayos de complementación mostraron que la construcción G39112 no era capaz de complementar la mutación condicional letal presente en el fago SPP1sus53 (mutación localizada en el gen 39), por lo que la delección de los 14 últimos aminoácidos de G39P comprometen su función biológica (Bailey *et al.*, 2003b). La proteína hΔ39N73 sin embargo si es capaz de inhibir la actividad ATPasa de G40P (aunque no afecta a su actividad helicasa; datos no mostrados), aunque su efecto es mucho menor que el de la proteína G39P completa (Figura 42, se precisan 7 veces más cantidad de proteína para producir una reducción de la actividad al 20%; Ayora, Stasiak y Alonso, 1999). En la figura se incluyó la primasa hDnaG como ejemplo de proteína que estimula la actividad ATPasa de G40P (Figura 42 A; Ayora, Langer y Alonso, 1998). Podría considerarse que para que G39P tenga un efecto pleno de inhibición de la actividad ATPasa de G40P precisa de su dominio amino terminal.

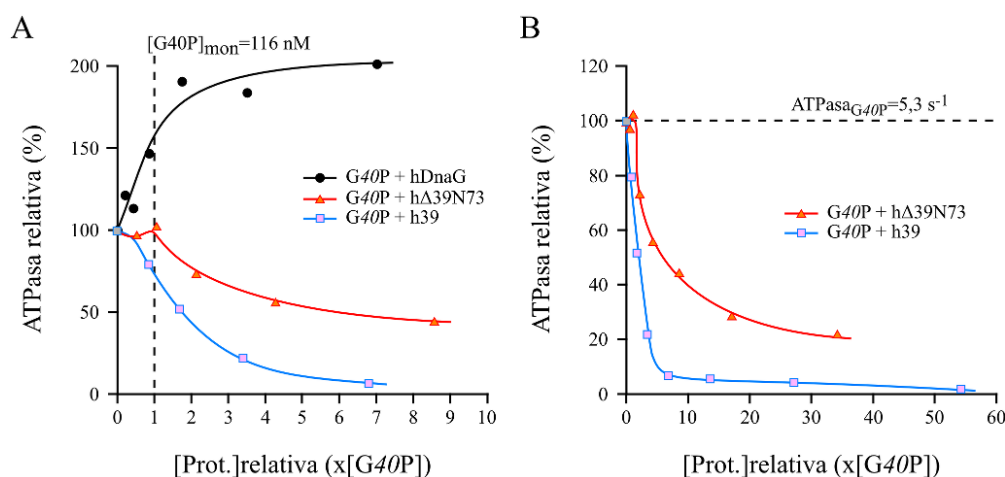


Figura 42. Inhibición de la actividad ATPasa de G40P por h39 y hΔ39N73.

A) Efecto de las proteínas h39, hΔ39N73 y hDnaG en la actividad ATPasa de G40P. La concentración de dichas proteínas se indica de manera relativa a la de G40P (116 nM). **B)** Se muestra un rango más amplio de concentración para las proteínas h39 y hΔ39N73. El 100 % de la actividad de G40P se corresponde con 5,3 s⁻¹.

4.7.3 Susceptibilidad de G39P a degradación proteolítica.

El hecho de que G39P se degradara durante el proceso de cristalización impulsó a caracterizar la sensibilidad de la proteína a ser digerida por proteasas. Se decidió usar Proteinasa K dada su amplia especificidad, ya que corta enlaces peptídicos adyacentes a aminoácidos alifáticos o aromáticos (Betzl *et al.*, 1993). Cuando G39P se incubó con Proteinasa K se generó un patrón de degradación característico, en el que rápidamente se degradaba una porción de la proteína que correspondía aproximadamente a la mitad de su tamaño, siendo el resto más resistente (Figura 43 A). El mismo proceso se llevó a cabo con h39, de manera que al pegar el resultado de la digestión a resina de níquel y eluir los fragmentos que contenían intacta la cola de histidinas (localizada en el amino terminal de h39), se pudo determinar que la degradación se llevaba a cabo desde el extremo carboxilo terminal de la proteína (Figura 43 A). El análisis por espectrometría de masas determinó el tamaño de los fragmentos obtenidos (Figura 43 C), de forma que al saberse que los péptidos debían mantener el extremo amino terminal intacto y conocerse la especificidad de la Proteinasa K se pudo determinar la posición de los cortes (Figura 43 D). Se confirmaba así que la mitad carboxilo terminal de G39P es mucho más sensible a degradación por la acción de una proteasa, debido a su mayor flexibilidad y al no estar completamente plegada como la mitad amino terminal.

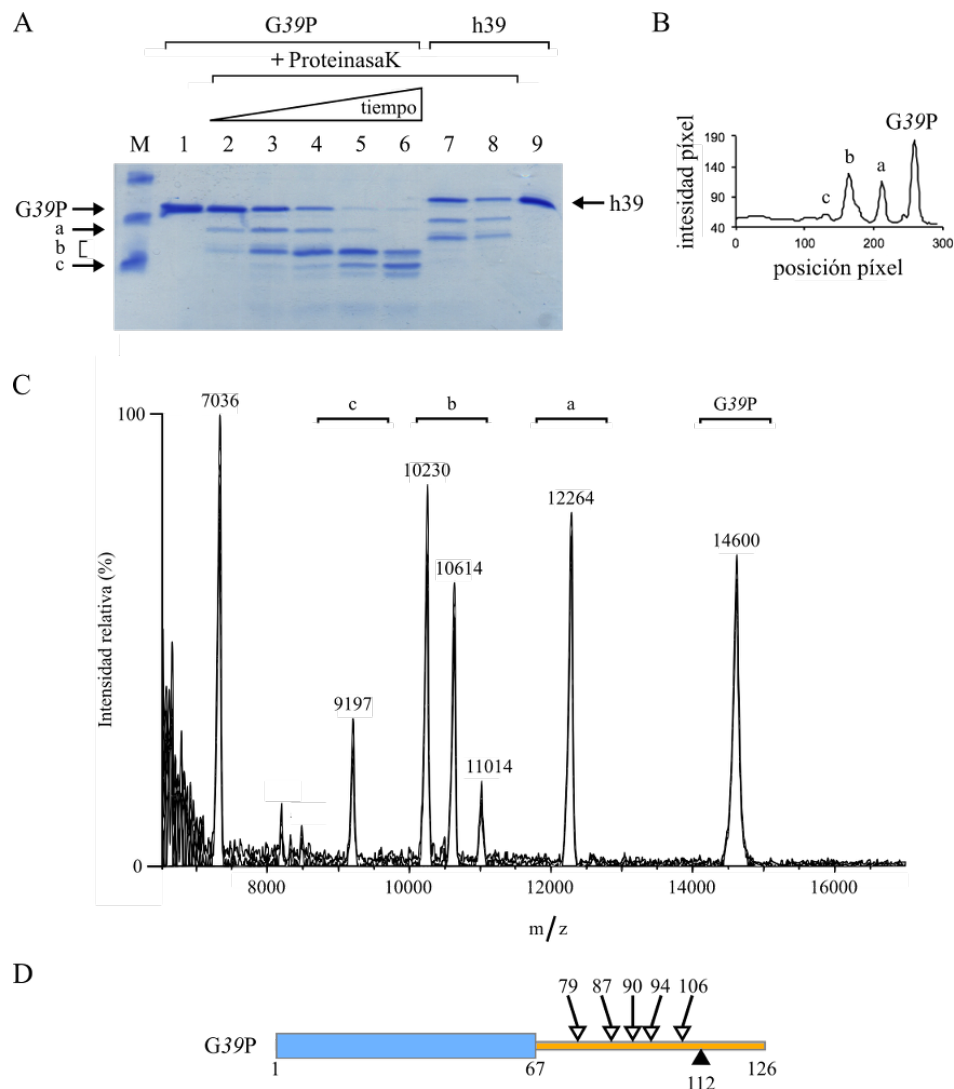


Figura 43. Proteólisis parcial de G39P.

A) Digestión de G39P con Proteinasa K. La muestra 1 se corresponde con G39P sin proteasa, en las muestra 2-6 G39P fue incubado con Proteinasa K durante distintos tiempos (0,5; 1; 2; 5 y 10 minutos). La muestra 9 contenía h39 y la muestra 7 se corresponde con la digestión de esta durante 1 minuto. En 8 se cargó la elución proveniente de resina de Ni de una muestra como la que se enseña en 7. Con a, b y c se indican distintas bandas de degradación. En M se muestran las bandas del marcador de peso molecular de proteínas (6,5 kDa; 14,4 kDa; 21,5 kDa). **B)** Cuantificación de las bandas presentes en la calle 3 del gel en (A). **C)** Resultado de la espectrometría de masas realizada sobre una muestra equivalente a la mostrada en el carril 3 de (A), incubada 1 minuto con Proteinasa K. Se indica la correspondencia con las bandas a, b y c en (A) y (B). **D)** Representación de los sitios de corte en G39P que produjo la incubación con Proteinasa K.

4.7.4 Protección de G39P frente a degradación.

Dada la elevada susceptibilidad de G39P a degradación y el hecho de que esta se llevase a cabo precisamente en la región con la que G39P interacciona con G40P, se decidió ver si tal sensibilidad se modificaba en presencia de G40P.

Como ya se ha visto anteriormente, G39P (14 kDa) queda reducido a fragmentos menores de 6 kDa cuando se incuba durante 5 minutos con Proteinasa K. En cambio G40P presenta una mayor resistencia a la degradación, de forma que su digestión parcial conduce a la aparición de bandas de un tamaño en torno a 33 kDa (bandas e y f en la Figura 44 A), 21 kDa (banda g) y 14 kDa (banda a). Este patrón de digestión es característico de proteínas del tipo DnaB y ha sido descrito previamente (Nakayama *et al.*, 1984b; Biswas y Biswas, 1999a) (Bird *et al.*, 2000), lo que permite localizar los cortes que se producen dentro de la secuencia de enlace que une los dominios amino y carboxilo de G40P (Figura 13). Las bandas e y f se corresponderían con el dominio carboxilo incluyendo distintas porciones de la secuencia de enlace y por otro lado las bandas g y b coincidirían con el dominio amino, también con distintos segmentos de la secuencia de enlace.

Curiosamente, cuando una mezcla de G39P y G40P se incuba en presencia de ATP con Proteinasa K, G39P queda en parte protegido (Figura 44 D; aumenta la cantidad de proteína sin degradar en la banda a y disminuye la cantidad de producto digerido en la banda c). Además, se produce una ligera sensibilización de G40P al corte con Proteinasa K (Figura 44 E; las bandas e, f y g aumentan su intensidad). Desafortunadamente la degradación de G40P produce también otra banda a la misma altura que ocupa la proteína G39P sin digerir, la banda a, por lo que no se puede distinguir la contribución de cada una a esa banda. En cualquier caso, el efecto que se produce en G39P se puede obtener atendiendo a los productos de su degradación.

Al añadirse ADNcs a la mezcla de G40P y G39P se revierten la protección de G39P y la sensibilidad incrementada en G40P (Figura 44 A, D y E; comparar datos de los pocillos 4 y 5). Cuando el ADNcs se añade a una mezcla que contiene únicamente G40P no se producen grandes cambios con respecto a una mezcla sin ADNcs (Figura 44 A y D; ligeramente varían la relación entre las bandas e y f, haciéndose la primera levemente más intensa).

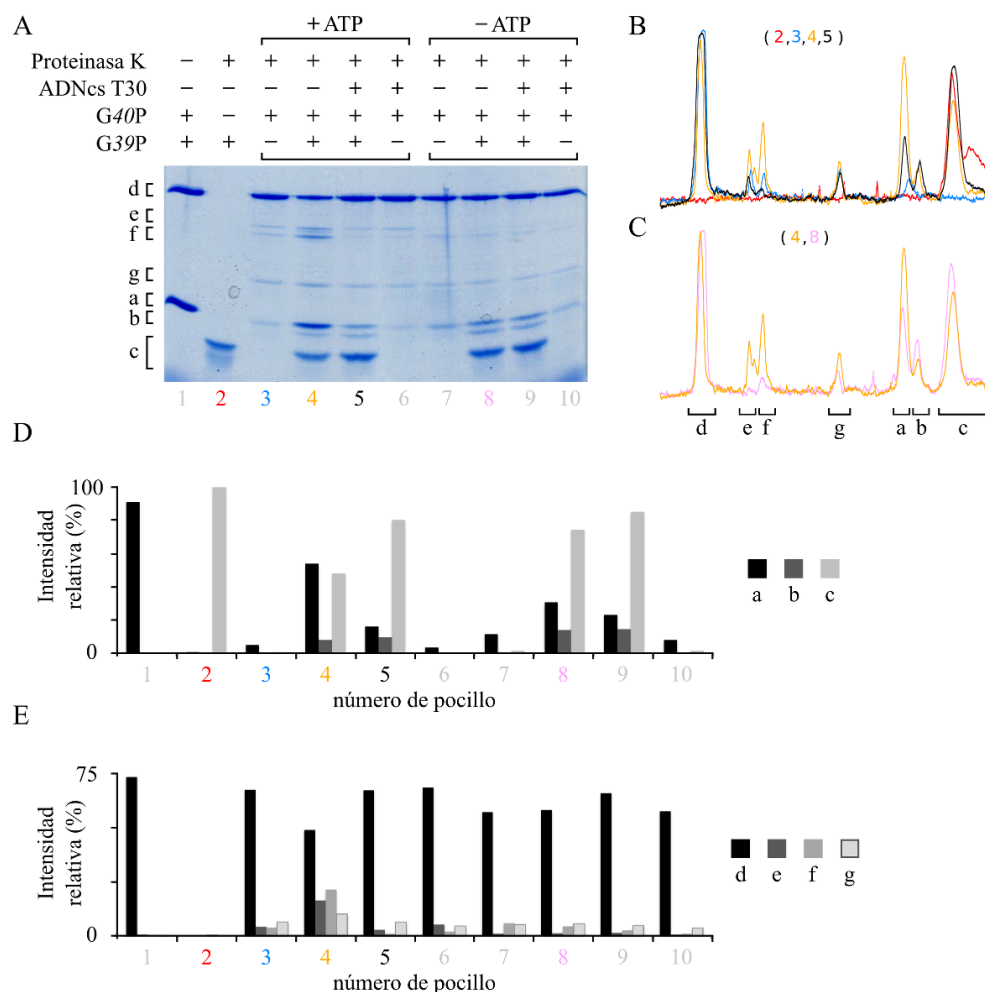


Figura 44. G40P protege a G39P frente a la degradación por Proteinasa K.

A) Proteólisis (5 minutos) de G39P en presencia de G40P y ADNcs [poli(dT)₃₀ 1 μ M]. **B)** y **C)** Análisis de las calles del gel indicadas. **D)** y **E)** Cuantificación de las bandas identificadas en (B) y (C). Con d, e, f y g se señalan las bandas pertenecientes exclusivamente a la degradación de G40P.

En ausencia de ATP la protección de G39P disminuye, pero se sigue dando, aunque a un nivel mucho más bajo que cuando el ATP está presente en la mezcla de reacción (Figura 44 A y D; comparar pocillos 2, 4 y 8). Al añadirse ADNcs a las mezclas en ausencia de ATP no hubo cambios. Estos resultados coinciden con que el hecho de que G40P precisa de ATP para que su interacción sea óptima tanto con ADNcs como con G39P (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999; Ayora *et al.*, 2002a).

Cuando el ATP se substituyó por ATP γ S se siguió produciendo protección de G39P frente a la acción de la Proteinasa K. Y esta se mantuvo incluso cuando se añadió ADNcs, por lo que en presencia de un análogo de ATP no hidrolizable, G40P no puede liberarse de G39P (Figura 45 A y B; pocillos 2, 4 y 5). Este resultado confirma experimentos previos en los que

Resultados

G39P inhibía la unión de G40P a ADNcs en presencia de ATP γ S (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999). G40P en presencia de ATP γ S y ADNcs parece incrementar ligeramente su sensibilidad a proteólisis (Figura 45 A y C; bandas e y f en pocillos 3, 4, 5 y 6), lo que podría correlacionarse con el hecho de que la presencia de un análogo de ATP no hidrolizable estabiliza la unión de G40P a ADNcs (Ayora *et al.*, 2002a). Es decir, G40P se encuentra en estados diferentes cuando se encuentra en presencia de ADNcs y ATP o ATP γ S, estados que se pueden diferenciar por una mayor exposición al corte por Proteinasa K en la región de conexión de los dos dominios de la proteína.

En presencia de ADP los resultados obtenidos fueron prácticamente iguales a los obtenidos en ausencia de nucleótido (Figura 44 y Figura 45).

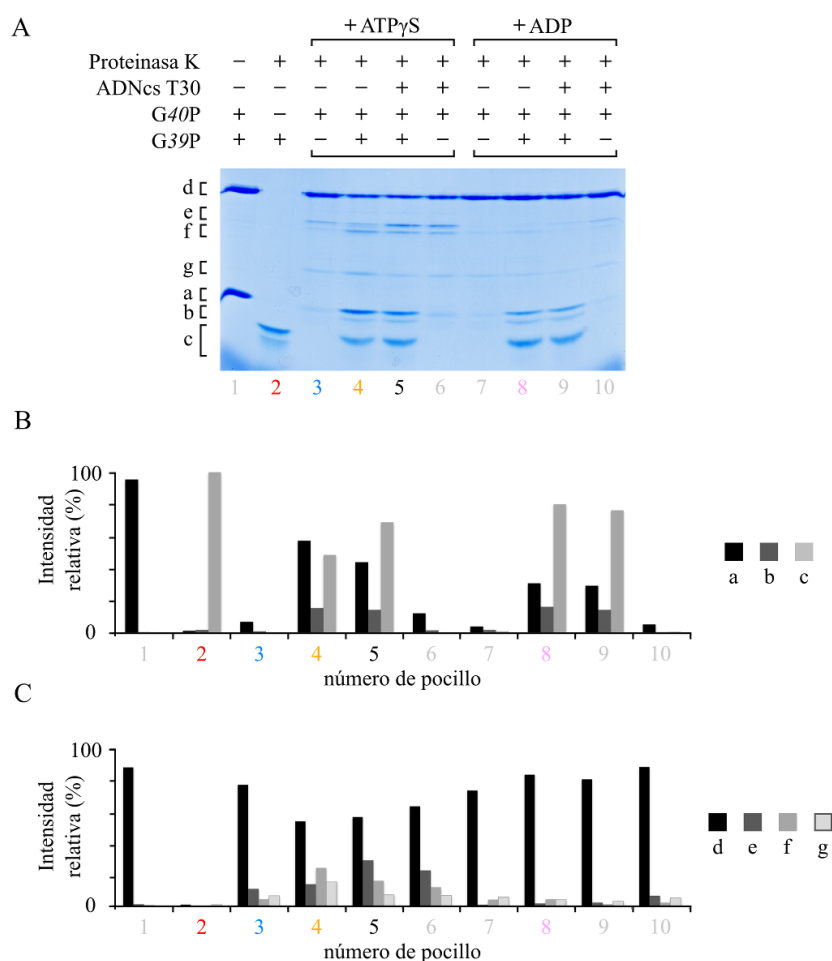


Figura 45. Protección de G39P frente a la degradación por Proteinasa K.

A) Proteólisis (5 minutos) de G39P en presencia de G40P y ADNcs [poli(dT)₃₀ 1 μ M] en las condiciones indicadas. **B)** y **C)** Cuantificación de las bandas identificadas en (A).

4.7.5 Estado oligomérico de G39P.

Resultados previos habían mostrado que G39P se comportaba en solución principalmente como un monómero, pero en equilibrio (muy desplazado hacia el monómero) con otras formas de mayor orden de oligomerización (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999; Bailey *et al.*, 2003b). Este comportamiento contrasta con el de la proteína con la que interacciona, G40P, que en presencia de ATP y MgCl_2 se comporta como un hexámero estable (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999; Ayora *et al.*, 2002a).

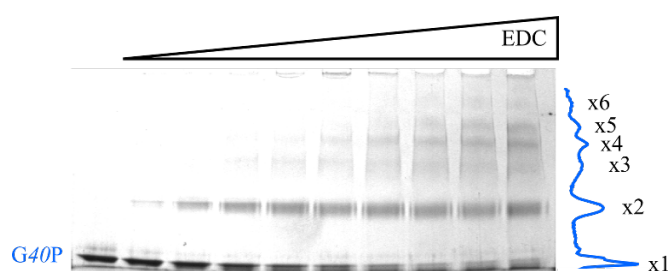


Figura 46. Entrecruzamiento químico de G40P.

G40P (2 μg) se incubó con distintas cantidades del agente EDC (0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 mM) con el fin de obtener una escalera de proteínas entrecruzadas. A la derecha se muestra la cuantificación del pocillo 7.

Con el fin de probar la existencia de otras formas de G39P más allá del monómero se optó por realizar experimentos de entrecruzamiento químico. Al aplicarse la técnica, empleando el agente de entrecruzamiento EDC, sobre muestras de G40P se pudo verificar la interacción (o proximidad) existente entre las distintas subunidades dentro del hexámero (Figura 46). Sin

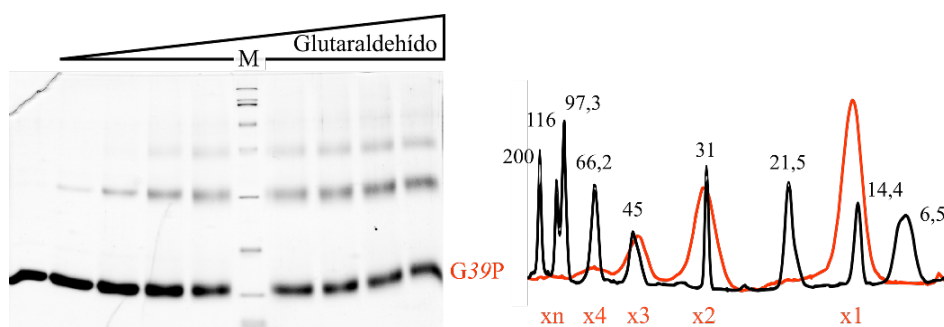


Figura 47. Entrecruzamiento de G39P.

G39P (2 μg) fue incubado en presencia de glutaraldehído (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 mM; 0,01-0,1 %). A la derecha se muestra la cuantificación del pocillo M (en negro; se muestra el tamaño de las proteínas del patrón de peso molecular, en kDa) y la del pocillo 7 (en rojo).

Resultados

embargo, G39P no experimentó entrecruzamientos con EDC o con SSD (datos no mostrados; estos son agentes de entrecruzamiento de especificidad elevada), aunque sí con glutaraldehído (Figura 47). De esta manera se detectó la formación de oligómeros por lo menos hasta la forma de tetrámero, confirmándose que G39P es capaz de establecer interacciones transitorias entre distintas subunidades a pesar de que su forma mayoritaria en solución sea el monómero.

Se verificó igualmente que h39, la versión de G39P con una cola de histidinas en el amino terminal, presentaba el mismo comportamiento al emplearse glutaraldehído como agente de entrecruzamiento (Figura 48).

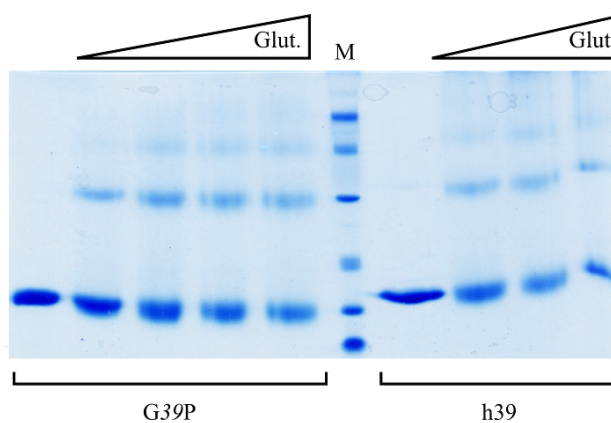


Figura 48. Entrecruzamiento con glutaraldehído de h39.

G39P y h39 (2 μ g) se incubaron con glutaraldehído (G39P: 0, 1, 2, 4 y 8 mM; h39: 0, 2, 4 y 8 mM).

4.7.6 Entrecruzamiento con luz ultravioleta de G39P y ADNcs.

Puesto que al usar una técnica de entrecruzamiento químico se había conseguido capturar a G39P en un estado efímero en el que se establecen contactos entre distintas subunidades, se decidió emplear una técnica similar para ver que ocurría en el momento en el que el complejo de G39P y G40P interaccionaban con ADNcs, el método de entrecruzamiento con ADN por irradiación con luz UV.

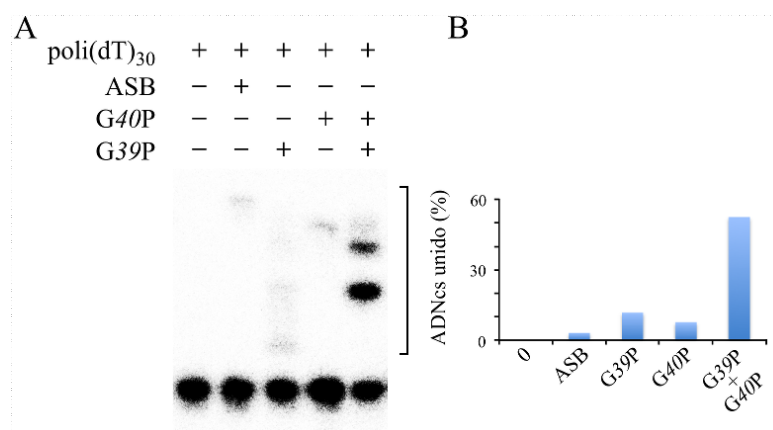


Figura 49. Entrecruzamiento de ADNcs con G39P, inducido por radiación UV.

A) Las proteínas indicadas se irradiaron con luz UV (254 nm) en presencia de poli(dT)₃₀. Se señala la zona donde aparece el ADNcs entrecruzado, que se separa del ADNcs libre. **B)** Cuantificación de las muestras en (A), se representa el porcentaje de ADNcs entrecruzado con proteína.

Ni G40P ni G39P, cuando se incubaron por separado, produjeron un patrón llamativo de entrecruzamiento con el ADN marcado (Figura 49). Sin embargo cuando el ADNcs se incubó con ambas proteínas, en presencia de ATP, se generaron unos complejos entrecruzados muy evidentes, que por el tamaño se correspondían a G39P unida al ADNcs. De hecho, no se generaron complejos mayores de los que daba G40P por sí sola, por lo que el entrecruzamiento se producía únicamente entre G39P y el ADNcs, pero para producirse se necesitaba la presencia de G40P. Como control, se incluyó una reacción que contenía albúmina de suero bovino (ASB), de manera que las bandas que compartían el mismo nivel de intensidad que la que se generó con ella se deberían considerar como entrecruzamientos inespecíficos.

Con el fin de comparar el resultado obtenido con G39P con otras proteínas que interaccionan con ADN, se repitieron los ensayos incluyéndose las proteínas G36P, G38P y hDnaG (Figura 50). G36P es otra proteína del fago SPP1 encargada de unir ADNcs (Ayora *et al.*, 2002b; Martínez-Jiménez, Alonso y Ayora, 2005), que pertenece a la familia de SSB/SsbA de Proteobacterias y Firmicutes (Lohman y Ferrari, 1994). G38P es la proteína de unión al origen de replicación del bacteriófago SPP1 (Pedré *et al.*, 1994; Ayora, Stasiak y Alonso, 1999;

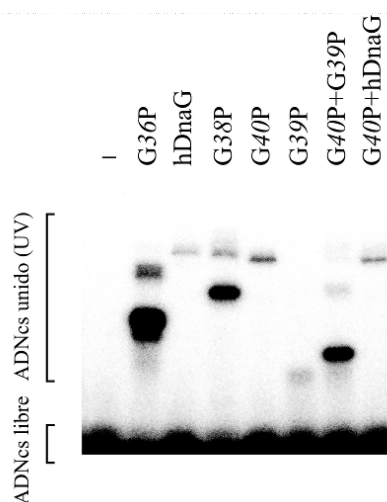


Figura 50. Entrecruzamiento UV de distintas proteínas con ADNs.

Las proteínas indicadas se incubaron con poli(dT)₃₀ y se irradiaron con luz UV.

Seco *et al.*, 2013). hDnaG es una variante de la proteína DnaG de *Bacillus subtilis* con una cola de histidinas en su extremo amino terminal. DnaG tiene actividad de primasa e interacciona con G40P (Ayora, Langer y Alonso, 1998).

Tanto G36P como G38P dieron un patrón intenso de entrecruzamiento con el ADNcs marcado, similar al que produce G39P en presencia de G40P. Sin embargo hDnaG y G40P dieron lugar a un menor grado de entrecruzamiento, siendo aún más bajo en el caso de G39P incubada sola. Luego, aunque el entrecruzamiento parece depender de varios factores, entre ellos la forma en que las proteínas interaccionan con el ADNcs, G39P produce uno tan

intenso como el de G36P. Si bien G38P debería interaccionar específicamente con ADNcd del origen de replicación de SPP1 (Missich *et al.*, 1997), se ha descrito que DnaA de *Aquifex aeolicus* interacciona con ADNs (Duderstadt, Chuang y Berger, 2011).

Como control, muestras iguales a las del experimento anterior, pero sin someterlas a luz UV, se emplearon en un ensayo de retardo en gel (Figura 51), verificándose que si bien G40P puede formar complejos con el ADNcs cuando se encuentra sola o en compañía de G39P, esta última no forma complejos estables detectables por esta técnica.

En el caso de los complejos formados cuando se incubaron juntas hDnaG y G40P, aunque en el ensayo de retardo en gel se observó que el complejo debía contener G40P y hDnaG, en los ensayos de entrecruzamiento con UV aparentemente era G40P la que mayoritariamente se unió covalentemente al

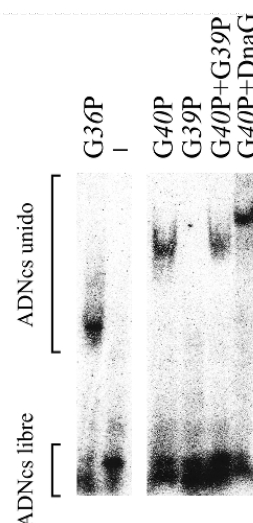


Figura 51. Interacción con ADNs de G39P y G40P.

La interacción con poli(dT)₃₀ de las proteínas especificadas se examinó en ensayos de retardo en gel (ver materiales y métodos). Condiciones iguales a las empleadas en los ensayos de entrecruzamiento por luz UV (Figura 50), salvo que las muestras no fueron irradiadas. La solución de reacción contenía 1 mM ATP.

ADNcs.

A continuación, se investigó el efecto de distintos nucleótidos en la formación del entrecruzamiento de G39P con ADNcs (Figura 52). La mayor cantidad de complejos G39P-ADNcs se obtuvieron en presencia de ATP, disminuyendo en torno a la mitad si se empleaba el análogo no hidrolizable ATP γ S o el producto ADP. Por lo tanto, el ATP es importante, pero no imprescindible, para la optimización del contacto o proximidad del ADNcs con G39P cuando esta está interaccionando con G40P. El mismo grado de disminución en la formación de complejos unidos covalentemente se obtuvo si en la mezcla de G40P-G39P se añadía la proteína hDnaG. En este sentido, se ha descrito para *E.coli* que la primasa DnaG al interaccionar con el complejo DnaB-DnaC (helicasa y cargador de la helicasa, respectivamente) puede forzar la salida de DnaC (Makowska-Grzyska y Kaguni, 2010).

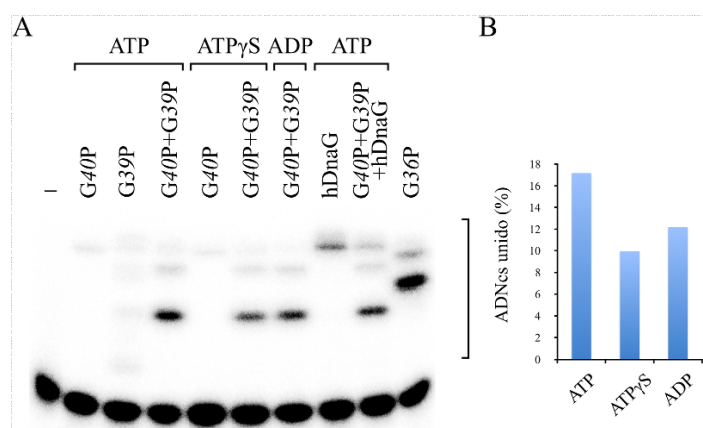


Figura 52. Entrecruzamiento de G39P con ADNcs en presencia de distintos nucleótidos.

A) Las proteínas indicadas en la figura se incubaron con poli(dT)30 marcado radiativamente y fueron irradiadas con luz ultravioleta. **B)** Comparación del porcentaje de ADNcs entrecruzado según el nucleótido incluido en la reacción.

Hay que tener en cuenta que, dado que se ha empleado ATP en los ensayos, este también podría bajo irradiación con UV convertirse en radical libre y reaccionar con la proteína, si bien al ser la base nitrogenada una purina la eficiencia es más baja que si fuera TTP (o más baja que en el caso del ADNcs utilizado en los experimentos).

Finalmente, se analizó cuál era el efecto que produciría la ausencia de determinadas regiones de la proteína G39P en la capacidad de esta para formar entrecruzamientos con el ADNcs (Figura 53). La proteína G39P112, que carece de los 14 últimos residuos de G39P necesarios para interaccionar con G40P (Figura 41), no produjo las bandas características de entrecruzamiento de G39P. Tampoco se obtuvieron cuando se empleó la proteína h39 Δ N73, que carece del dominio amino terminal plegado de G39P pero mantiene su capacidad de

Resultados

interaccionar con G40P. Con el fin de verificar que la cola de histidinas presente en h39ΔN73 no estaba inhibiendo de alguna manera la formación de los complejos con ADNcs se comprobó el efecto de sustituir en las reacciones a G39P por h39. Esta última sí fue capaz de producir las mismas bandas de entrecruzamiento con ADNcs marcado que G39P, ligeramente desplazadas hacia arriba por la presencia de la secuencia añadida a la proteína. En definitiva, G39P precisa de la secuencia de interacción con G40P para poder establecer contactos con el ADNcs o estar en su proximidad, e igualmente precisa del dominio amino terminal

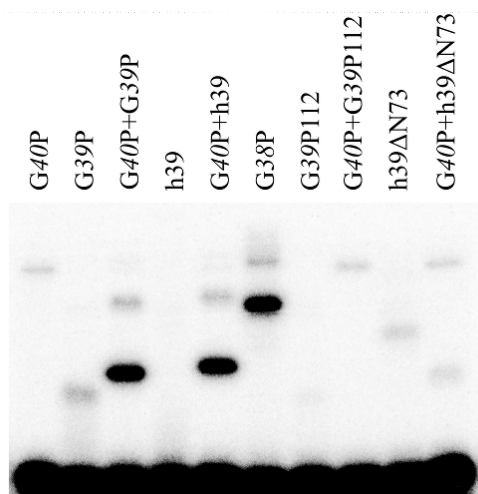


Figura 53. Entrecruzamiento de ADNcs con versiones de delección de G39P.

Las proteínas indicadas se incubaron con poli(dT)₃₀ marcado en presencia de ATP y se irradiaron con luz UV para propiciar la formación de entrecruzamientos.

4.7.7 Estudio de la interacción entre G39P y G40P mediante ensayos FRET.

Dadas las características de la dinámica de la interacción entre G40P y G39P se decidió desarrollar una “herramienta molecular” que permitiera evaluar la interacción entre ambas proteínas mediante ensayos FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster) (Weiss, 2000; dos Remedios y Moens, 1995; Piston y Kremers, 2007). Con ella se trataría de evaluar la oligomerización de G39P sobre G40P (Figura 54), tomándose como modelo experimental el

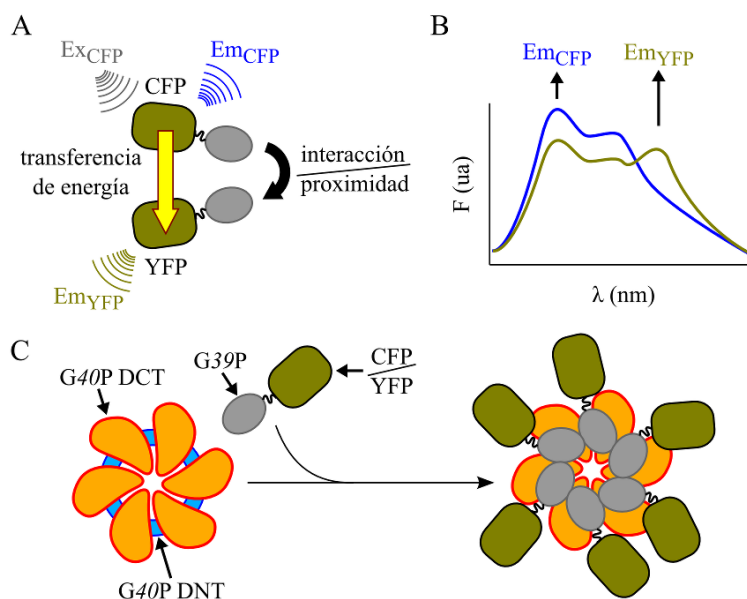


Figura 54. Ensayo FRET de interacción entre G39P y G40P.

A) Esquema del fenómeno de FRET entre fusiones de CFP/YFP. Las indicaciones Ex y Em representan la radiación electromagnética de excitación y emisión, respectivamente. Cuando las fusiones quedan físicamente próximas, al excitar la muestra con radiación de longitud de onda que coincide con el pico de absorción específico de la proteína CFP (433 nm; el de YFP es 514 nm) se produce una transferencia de energía hacia YFP que da lugar a la emisión de fluorescencia con el máximo característico de esta (526 nm), con la consecuente disminución de la emisión de fluorescencia por parte de CFP (pico de emisión a 478 nm). B) Ejemplos de espectros de emisión de ensayos FRET. Se compara el perfil de intensidad de fluorescencia de un ensayo en el que no hay FRET (CFP e YFP están demasiado distantes; azul) con uno en el que CFP e YFP quedan más próximas y por lo tanto se produce FRET (verde). Se indican las posiciones de los picos de emisión de CFP (478 nm) e YFP (526 nm), observándose que cuando se produce FRET disminuye la intensidad de la fluorescencia en el pico característico de CFP y aparece un nuevo pico que se corresponde con la emisión de YFP. C) Esquema de la interacción entre G40P y las fusiones de G39P con GFP (ya sea CFP o YFP). Se asume que tal interacción hace que las partes de GFP de las fusiones queden localizadas cercanas, favoreciéndose que se produzca el fenómeno de FRET. La distribución sobre el hexámero de G40P de las dos variantes de GFP empleadas, CFP e YFP, se considera aleatoria. El hexámero de G40P se representa mediante dos anillos superpuestos: el de los dominios ATPasa o carboxilo terminales, en naranja, y el de los dominios amino terminal, en azul. Aunque G39P se sitúa en el esquema en la cara de los dominios carboxilo terminal, realmente no se dispone de información sobre cuál es su orientación sobre el hexámero de G40P.

Discusión

caso de las proteínas “camaleón” desarrolladas para medir los niveles de Ca^{2+} intracelular en base al comportamiento de la calmodulina (Miyawaki *et al.*, 1997).

Se llevó a cabo así la construcción de dos variantes de G39P, que consistían en fusiones con las proteínas YFP o CFP (variantes de la proteína de fluorescencia verde, GFP) (Miyawaki y Tsien, 2000) y que contenían una secuencia de seis histidinas en su extremo amino terminal (Figura 55 A). Necesariamente, como primer paso se verificó que estas dos proteínas, hCFP39 y hYFP39, eran capaces de interaccionar con G40P en ensayos de retención en resina de níquel, tal y como lo hace h39 (Figura 55 B y Figura 41). La base de los experimentos FRET consiste en que si, al interaccionar estas fusiones de G39P con el hexámero de G40P, las porciones de

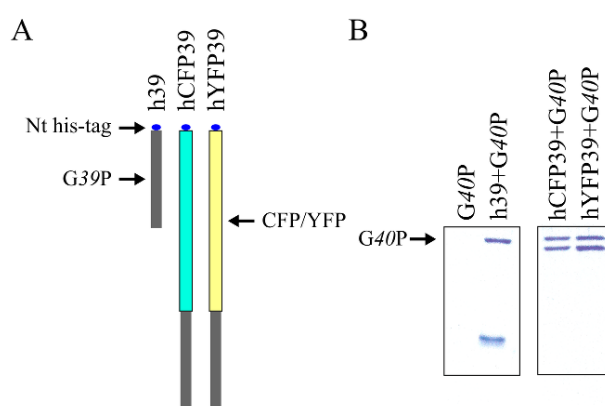


Figura 55. Interacciones de las fusiones de G39P-CFP/YFP con G40P.

A) Esquema de las construcciones hCFP39 y hYFP39. **B)** G40P puede interaccionar con ambas construcciones, tal y como se muestra en los ensayos de retención en resina de níquel.

YFP y CFP quedan lo suficientemente próximas entre sí se producirá transferencia de energía de resonancia desde CFP hacia YFP. Por ello, al irradiar las muestras con una longitud de onda a la que se excita casi exclusivamente CFP se emitirá fluorescencia a una longitud de onda característica de YFP, que no es excitada directamente (Figura 54 A y B). La eficiencia de la transferencia de energía de resonancia depende estrictamente de la distancia entre los cromóforos (YFP y CFP en este caso), en concreto es inversamente proporcional a la sexta potencia de dicha distancia, por lo que el fenómeno de transferencia solo se produce cuando los cromóforos están muy próximos entre sí (1-10 nm). Por lo tanto si se detecta FRET en las medidas de fluorescencia realizadas con estas proteínas, se puede afirmar que los dominios amino terminales de G39P, a los que están fusionadas las versiones de GFP, se encuentran próximos entre sí cuando distintas G39P interaccionan con las subunidades del hexámero de G40P. Dado que la disposición de los dos tipos de fusiones de G39P sería aleatoria sobre el anillo que forma G40P, no se puede llevar a cabo un cálculo estricto de la distancia existente, pero sí se pueden obtener medidas que indiquen si hay o no oligomerización indirecta de G39P

sobre el hexámero de la helicasa. El diseño general de los experimentos consistió en incubar una mezcla equimolar de hCFP39 y hYFP39 en presencia de G40P, de manera que si se producía el efecto FRET se debería observar un incremento del pico de emisión propio de YFP (526 nm) y una reducción de la fluorescencia debida a CFP (pico a 478 nm; Figura 54 B). Por ello se tomó la razón ($\text{Fluorescencia}_{526\text{nm}} / \text{Fluorescencia}_{478\text{nm}}$) como un cuantificador de la transferencia de energía inducida por la proximidad de las partes YFP y CFP de las fusiones con G39P.

4.7.8 Validación inicial del sistema FRET hCFP39-hYFP39.

El estudio preliminar del par hCFP39-hYFP39 confirmó que no se producía de manera sustancial un efecto FRET en ausencia de G40P. Sin embargo, si se comparaban los resultados de experimentos realizados a distintas concentraciones de NaCl sí que se podía identificar un

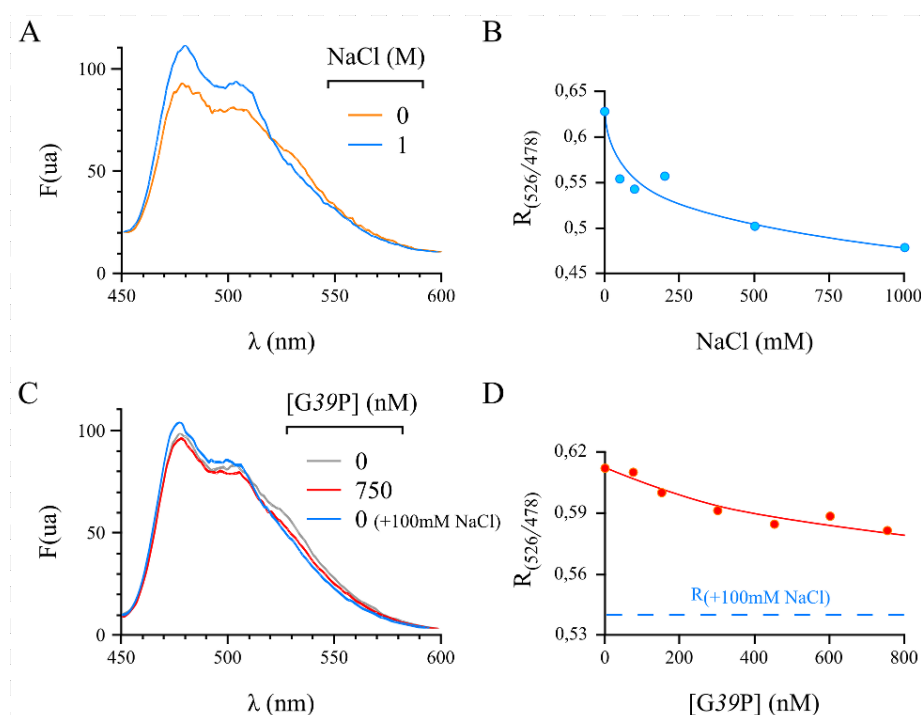


Figura 56. FRET del par hCFP39-hYFP39 en ausencia de G40P.

A) Comparación de los espectros de emisión de muestras hCFP39-hYFP39 a 0 y 1 M NaCl. **B)** Efecto de la concentración de NaCl en la razón $R_{(526/478)}$, que es un cuantificador del efecto FRET. **C)** Efecto de la presencia de G39P en la transferencia de energía de resonancia experimentada por la mezcla de hCFP39 y hYFP39. **D)** Comparación de la disminución del efecto FRET, al aumentar la concentración de G39P, con el valor basal obtenido sin G39P y en presencia de 100 mM NaCl.

pequeño efecto de FRET a bajas concentraciones de NaCl (Figura 56 A y B). La asociación espontánea y transitoria de G39P (de la que ya se habló anteriormente) en forma de dímeros u

Discusión

oligómeros de orden mayor podría dar cuenta de este pequeño efecto FRET. Igualmente, también podría explicarse por la asociación de las proteínas por interacción de la parte CFP/YFP (Zacharias *et al.*, 2002). La competencia generada por la adición de G39P a la mezcla de hCFP39-hYFP39 consiguió reducir los valores de FRET obtenidos, aunque no a valores tan bajos como los obtenidos a mayores concentraciones de NaCl (Figura 56 C y D). En consecuencia, parte de este leve efecto de transferencia entre los pares hCFP39-hYFP39 podría deberse a la asociación temporal de las regiones correspondientes a G39P.

Con el análisis anterior se estableció el nivel basal con respecto al que comparar ensayos en los que sí se produjese efecto FRET. A continuación, con el fin de obtener la parte complementaria, se diseñó una serie de experimentos en los que se forzaría la obtención de niveles elevados de transferencia de energía de resonancia al imponer la máxima proximidad de

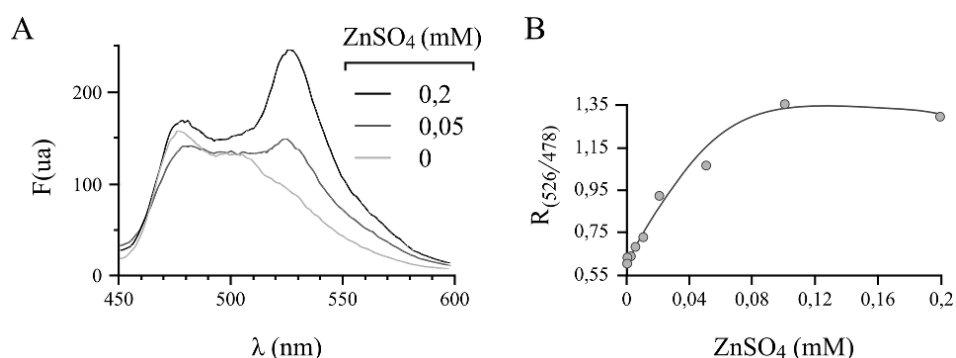


Figura 57. Asociación de hCFP39 y hYFP39 en presencia de Zn^{2+} .

A) Efecto de la concentración de Zn^{2+} en el espectro de emisión del par hCFP39-hYFP39. **B)** El incremento de la concentración de ZnSO_4 aumenta la razón $R_{(526/478)}$.

las porciones GFP de las fusiones. Esto se logró al añadir zinc a la solución de reacción, ya que sus iones son capaces de interaccionar con las colas de histidinas de las fusiones hCFP39 y hYFP39, por lo que se consigue su dimerización (Evers *et al.*, 2008). Así, en presencia de concentraciones por encima de 0,1 mM de ZnSO_4 el espectro de emisión del par hCFP39-hYFP39 varía drásticamente, siendo el pico de fluorescencia a 526 nm 1,3 veces mayor que el pico a 478 nm (Figura 57 A).

Quedaban entonces definidos los valores mínimos y máximos entre los que se debían situar los resultados de los ensayos a realizar.

4.7.9 G40P promueve el efecto de FRET entre hCFP39 y hYFP39.

En presencia de G40P se pudo comprobar que se estimulaba claramente la transferencia de energía de resonancia entre las proteínas hCFP39 y hYFP39. A medida que la concentración de G40P aumentaba en las muestras analizadas (que contenían 110 nM de la suma de hCFP39 y hYFP39) el pico característico de emisión de la YFP se incrementaba igualmente hasta alcanzar la misma altura que el pico de emisión de la CFP (Figura 58 A). Para valores de concentración de G40P por encima de 100 nM la razón $R(526/478)$ comienza a disminuir (Figura 58 B), dado que las fusiones de G39P con CFP/YFP empiezan a distribuirse en una relación menor a 1:1 sobre los hexámeros de G40P y por lo tanto se produce un efecto de dilución que hace que menos pares hCFP39-hYFP39 se encuentren próximos. Por lo tanto, la asociación de la parte que corresponde a G39P sobre el hexámero de G40P promueve que las partes CFP/YFP de las fusiones se dispongan de manera contigua, lo que favorece que se produzca el efecto de FRET con mayor eficiencia.

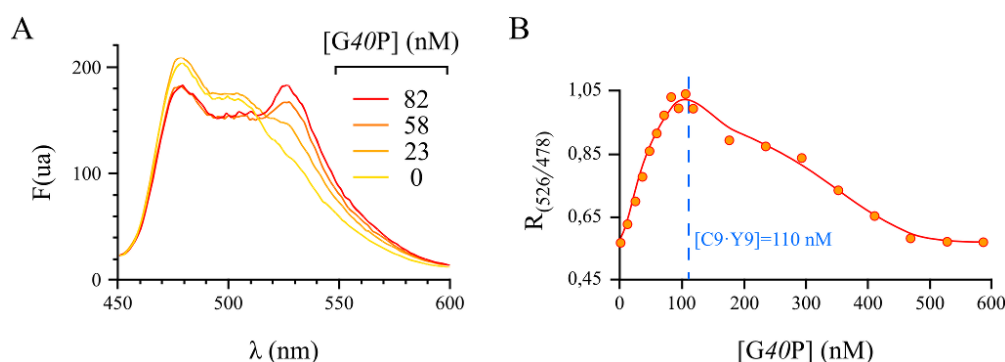


Figura 58. Efecto FRET en presencia de G40P.

A) Comparación de los espectros de emisión de la mezcla de hCFP39 y hYFP39 a distintas concentraciones de G40P. **B)** G40P tiene un doble efecto sobre el fenómeno de transferencia de energía de resonancia que se produce entre hCFP39 y hYFP39. Al aumentar la concentración de G40P hasta aproximadamente 100 nM el indicador de FRET $R(526/478)$ se incrementa progresivamente, pero a partir de ese valor de concentración de G40P (que coincide con la suma de las concentraciones de hCFP39 y hYFP39, indicada como $[C9 \cdot Y9]$) el efecto FRET va disminuyendo.

Puesto que el complejo G40P-G39P es sensible a la concentración de NaCl presente en el medio, se decidió confirmar la desestabilización de la interacción entre ambas proteínas en condiciones de creciente concentración de esta sal (Figura 59 A). Esta sensibilidad a NaCl pudo comprobarse previamente en la purificación de G40P a partir del complejo h39-G40P. Incluso a concentraciones relativamente bajas de NaCl (<200 mM) se produce una caída fuerte del efecto FRET, debida a la pérdida de la interacción entre G39P y G40P.

Discusión

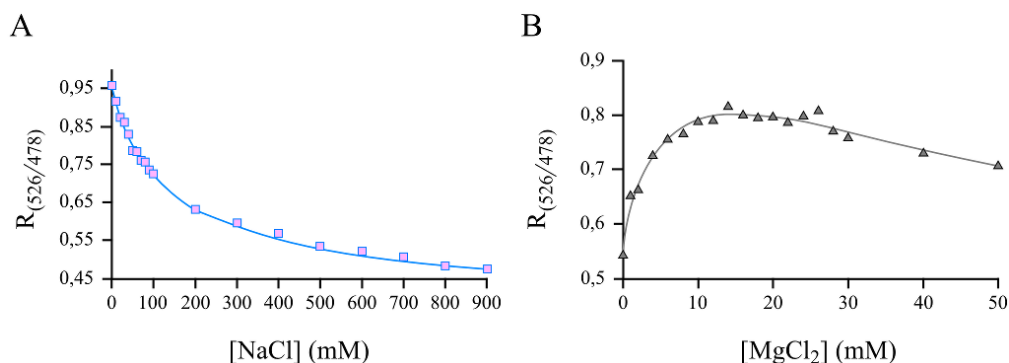


Figura 59. Efecto de la concentración de NaCl y $MgCl_2$ sobre el efecto FRET.

A) El incremento de la concentración de NaCl en la solución de reacción disminuye el efecto de transferencia de energía de resonancia. **B)** Efecto de la concentración de $MgCl_2$ en la razón $R_{(526/478)}$.

También se decidió analizar el efecto de la concentración de $MgCl_2$, pues a parte de ser necesario el Mg^{2+} para la unión de ATP a G40P también influye en la estabilidad del hexámero (Ayora *et al.*, 2002a). Como puede observarse (Figura 59 B), la concentración óptima de $MgCl_2$ para que se produzca el máximo de transferencia de energía de resonancia se encuentra en el rango de 10-20 mM; a concentraciones más altas el Mg^{2+} parecía producir un efecto negativo. A tenor de estos resultados se decidió emplear en los ensayos concentraciones de 15 mM $MgCl_2$ y 25 mM NaCl.

Con el fin de verificar el funcionamiento del sistema se realizaron ensayos de competencia en los que G39P rivalizaba con las fusiones hCFP39 y hYFP39 por la unión a

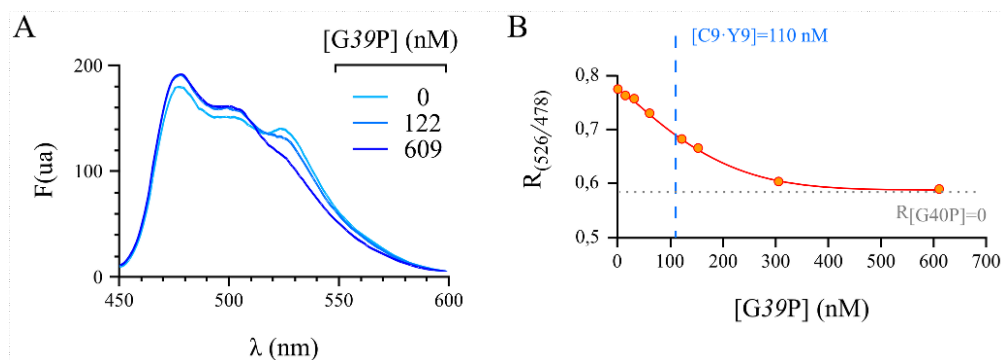


Figura 60. Competencia con G39P en ensayos FRET.

A) Al añadir distintas concentraciones de G39P a reacciones que contenían hCFP39, hYFP39 y G40P (94 nM) se produjo una reducción de la transferencia de energía de resonancia. **B)** Se muestra la disminución del valor $R_{(526/478)}$ según se incrementa la concentración de G39P. Como referencias se indican el valor alcanzado en experimentos en los que G40P no está presente, $R_{[G40P]=0}$, y la suma de la concentración de hCFP39 y hYFP39, $[C9-Y9]=110$ nM.

G40P (Figura 60). Concentraciones crecientes de G39P disminuyeron la transferencia de energía de resonancia, de manera que a una concentración alta de G39P, 609 nM, el efecto FRET era tan bajo como cuando no se añadía G40P a las reacciones. Cabe destacarse que a una concentración de G39P de 122 nM la razón $R(526/478)$ fue el 50 % del valor que alcanzó en ausencia de G39P, lo cual se corresponde con un efecto perfecto de competencia ya que la concentración total de las fusiones de G39P con CFP/YFP era 110 nM. De esta manera se verificaba que las medidas de efecto FRET se debían exclusivamente a la interacción entre G40P y la parte correspondiente a G39P, y que las regiones de las fusiones que se corresponden con las variantes de GFP no parecían tener un efecto en esa interacción.

También se comprobó que el mutante de delección G40P Δ N109 era capaz de sustituir a G40P en el papel de plataforma sobre la que se disponen las fusiones de G39P para que se produzca el efecto FRET (Figura 61). G40P Δ N109 alcanza el máximo efecto de transferencia de energía de resonancia a una concentración menor que la que se precisa con G40P y a su vez el valor de $R(526/478)$ alcanzado es mayor (Figura 61 B). Esto podría reflejar una mayor flexibilidad del mutante, al carecer del dominio amino terminal de G40P, que podría favorecer la interacción con G39P, a la vez que le permitiría alcanzar una conformación que es más propicia para que las fusiones de G39P queden más próximas entre sí.

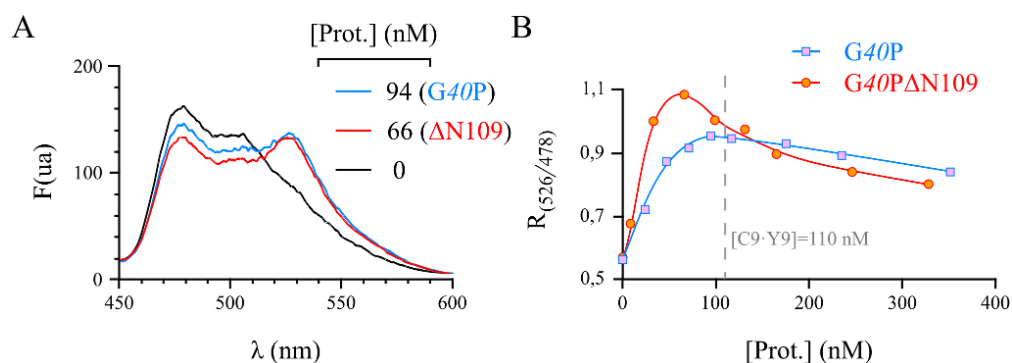


Figura 61. Interacción de G40P Δ N109 con hCFP39-hYFP39.

A) Comparación de los perfiles de emisión de fluorescencia de la mezcla hCFP39-hYFP39 sola, con G40P y en presencia de G40P Δ N109. B) Cotejo del efecto de distintas concentraciones de G40P y G40P Δ N109 en la razón $R(526/478)$.

4.7.10 La importancia del ATP en el efecto FRET promovido por G40P.

Como se ha mostrado previamente la interacción entre G40P y G39P se optimiza en presencia de ATP, aunque este no es estrictamente necesario (Figura 44 y Figura 52). Por ello se decidió investigar cómo dependía del ATP la interacción del par hCFP39-hYFP39 con G40P.

Discusión

Se observó que en ausencia de ATP no se producía el fenómeno de transferencia de energía de resonancia entre hCFP39 y hYFP39 (Figura 62 A). A medida que aumentaba la concentración

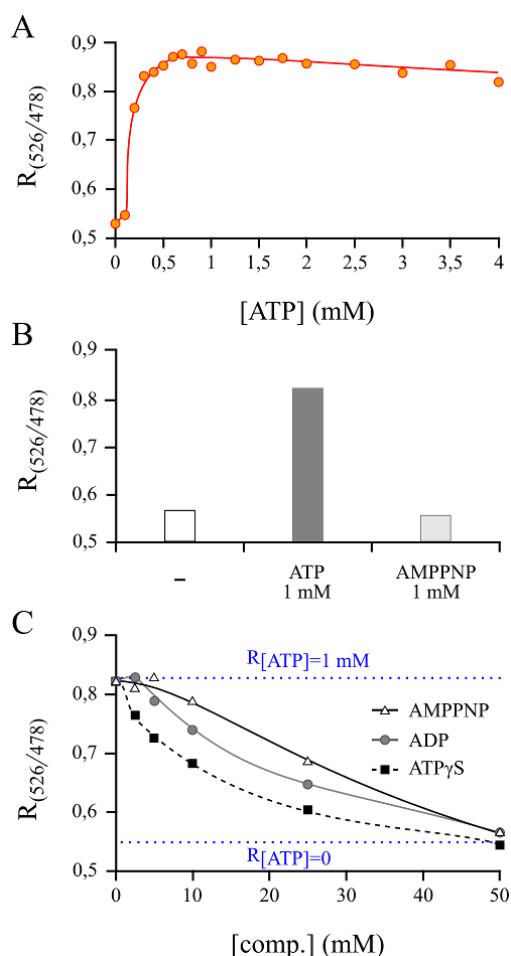


Figura 62. Influencia del ATP en los ensayos FRET.

A) La señal FRET obtenida por la mezcla de *G40P* (94 nM) con hCFP39 y hYFP39 (110 nM) depende de la concentración de ATP. **B)** El AMPPNP no puede sustituir el efecto del ATP en este tipo de reacciones. **C)** Los nucleótidos AMPPNP, ADP y ATP γ S compiten con el ATP (1 mM), reduciendo el efecto FRET. Se indican los valores de $R(526/478)$ obtenidos en presencia y ausencia de ATP, sin competidores.

de ATP se produjo un incremento brusco del efecto FRET, alcanzándose el máximo valor de $R(526/478)$ a una concentración de en torno a 1 mM. A diferencia de lo que ocurría con las actividades ATPasa y helicasa de *G40P* (Figura 18 y Figura 27), la interacción entre hCFP39/hYFP39 y *G40P* no se vio afectada negativamente de manera significativa por la adición de concentraciones elevadas de ATP. Al sustituir el ATP por AMPPNP, un análogo no hidrolizable, no se observó efecto FRET, por lo que la interacción resultaba ser estrictamente dependiente de ATP (Figura 62 B). De hecho se observó que al añadir a las reacciones distintas concentraciones de AMPPNP, ATP γ S y ADP, en presencia de 1 mM ATP, estos nucleótidos se comportaban como competidores e inhibían la interacción entre *G40P* y hCFP39/hYFP39, reduciendo los valores de fluorescencia producida por el efecto FRET.

Como esta dependencia tan estricta contrastaba con resultados previos, se decidió analizar el comportamiento de las fusiones de *G39P* con variantes de GFP en ensayos de retención en resina de níquel

(Figura 63). Al realizar dichos ensayos se comprobó que hCFP39 únicamente era capaz de retener a *G40P* cuando estaban presentes en la solución de reacción ATP y $MgCl_2$. Los nucleótidos AMPPNP y ADP no podían sustituirlo, ni tampoco el usar ATP o $MgCl_2$ solos. Se verificaba por lo tanto el resultado obtenido en los ensayos de medidas de fluorescencia. Sin embargo, los resultados eran completamente distintos cuando se empleaba la proteína h39

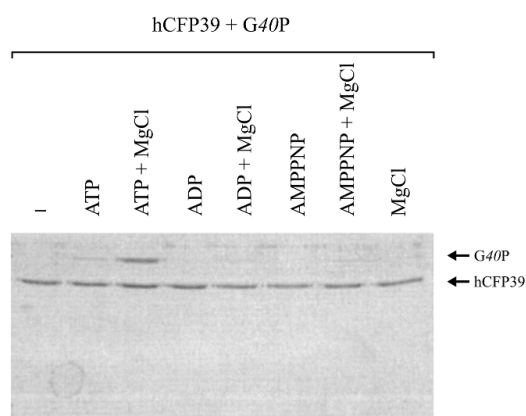


Figura 63. Interacción de hCFP39 con G40P en presencia de nucleótidos.

Se muestran los resultados de ensayos de retención en resina de níquel, en los que se comprobó si hCFP39, que contenía una secuencia de 6 histidinas y por lo tanto se unía a la resina, era capaz de retener a G40P bajo las distintas condiciones experimentales indicadas. Las concentraciones empleadas fueron 1 mM nucleótido (ATP, ADP y AMPPNP) y 10 mM MgCl₂.

(Figura 64). Esta era capaz de interaccionar en los ensayos de retención en resina de níquel con G40P en todas las condiciones analizadas, aunque la unión era óptima en presencia de ATP y MgCl₂. Únicamente cuando se añadió EDTA se produjo un descenso acusado de la cantidad de G40P retenida, pero esto se debía a la retirada de parte de los iones de níquel que hizo que disminuyera la cantidad de h39 inmovilizada en la resina. Por lo tanto la presencia de la porción CFP/YFP en las construcciones de G39P debe tener algún efecto en la interacción con G40P, haciendo que esta pase a ser estrictamente dependiente de la presencia de ATP y de que este se pueda hidrolizar.

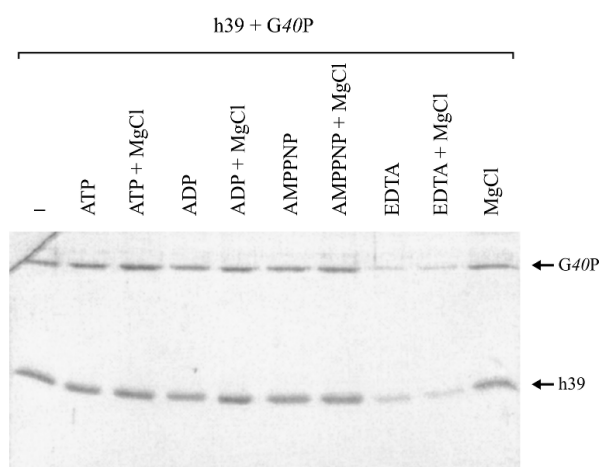


Figura 64. Interacción de h39 con G40P en presencia de nucleótidos.

En los ensayos se verificó la capacidad de h39, unida a resina de níquel mediante la secuencia de 6 histidinas que contiene, de retener a G40P en las condiciones especificadas. Las concentraciones empleadas fueron 1 mM nucleótido (ATP, ADP y AMPPNP), 10 mM MgCl₂ y 2 mM EDTA.

Discusión

El comportamiento de hCFP39 en este tipo de ensayos era tal, que se pudo reproducir el resultado obtenido en los ensayos FRET, es decir que la cantidad de G40P retenida en la resina de níquel por mediación de hCFP39 fuese dependiente de la concentración de ATP disponible en la solución de reacción (Figura 65).

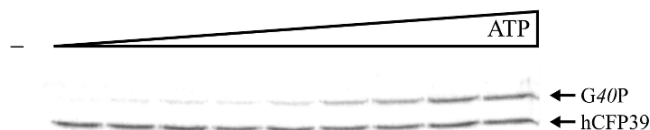


Figura 65. Retención de G40P frente a la concentración de ATP.

Se llevó a cabo un gradiente de concentración de ATP para demostrar la dependencia que presentaba la inmovilización de G40P en resina de níquel mediada por hCFP39. Las concentraciones de ATP empleadas fueron 0; 0,01; 0,05; 0,07; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 y 1 mM. El símbolo (-) indica el control en el no se incluyó hCFP39 en la reacción, pero sí G40P.

4.7.11 Alteración de la unión entre G40P y G39P en ensayos FRET.

Finalmente, se decidió realizar ensayos que afectaran a la señal de FRET mediante la adición de componentes que promovieran la interrupción del contacto entre G40P y G39P.

Con anterioridad se había observado que la adición de ADNcs liberaba a G39P de la protección que le proporcionaba G40P frente a la acción de la Proteinasa K (Figura 44). Por ello, se decidió comprobar si la señal FRET producida por la proximidad de hCFP39 y hYFP39 en presencia de G40P se podía ver afectada por la incorporación de ADNcs. Cuando en la mezcla de reacción que contenía hCFP39-hYFP39 se incorporaba G40P y distintas concentraciones de poli(dT)₃₀ pudo observarse que se producía una progresiva disminución de

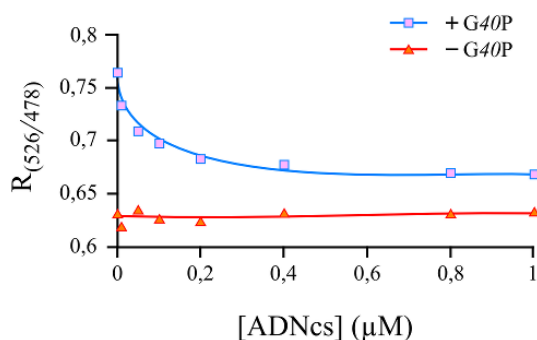


Figura 66. Efecto de la adición de ADNcs en la señal de FRET.

A) Atenuación en la transferencia de energía de resonancia entre hCFP39 y hYFP39 (110 nM; 94 nM G40P) producida por distintas concentraciones de poli(dT)₃₀.

la señal de FRET según las concentraciones de ADNcs aumentaban (Figura 66). En ausencia de G40P, pero bajo el mismo gradiente de ADNcs, no se produjo ninguna alteración en los valores de fluorescencia emitida por la mezcla de hCFP39 y hYFP39, por lo que se demostraba por un lado que el ADNcs no interfería en la fluorescencia de las fusiones de G39P, y por otra parte se comprobaba que dichas construcciones no son capaces de contactar con el ADNcs y oligomerizar sobre él por sí solas. También puede destacarse que los valores de la razón $R(526/478)$ en el gradiente de ADNcs realizado en presencia de G40P no disminuyen hasta los valores mínimos del gradiente en ausencia de G40P, lo que indicaría que se mantiene siempre una fracción de complejo hCFP30-hYFP39-G40P, probablemente como paso previo al cargado en el ADN dentro del ciclo dinámico de unión y liberación del complejo G40P-ADNcs.

Dado que previamente se había comprobado que el entrecruzamiento de G39P con ADNcs promovido por G40P podía entorpecerse en presencia de hDnaG (Figura 52), se decidió comprobar el efecto de dicha proteína en la señal de FRET estudiada. Así, se pudo comprobar que la primasa hDnaG interfirió negativamente en la formación del complejo de G40P con las fusiones de G39P, lo que ocasionó la disminución de la transferencia de energía de resonancia a medida que se aumentaba la concentración de hDnaG (Figura 67 A). En este sentido, G39P y DnaG se excluirían de forma recíproca en la formación de un complejo con G40P de manera similar a como ocurre con DnaC y DnaG en el complejo con DnaB de *E.coli* (Makowska-Grzyska y Kaguni, 2010).

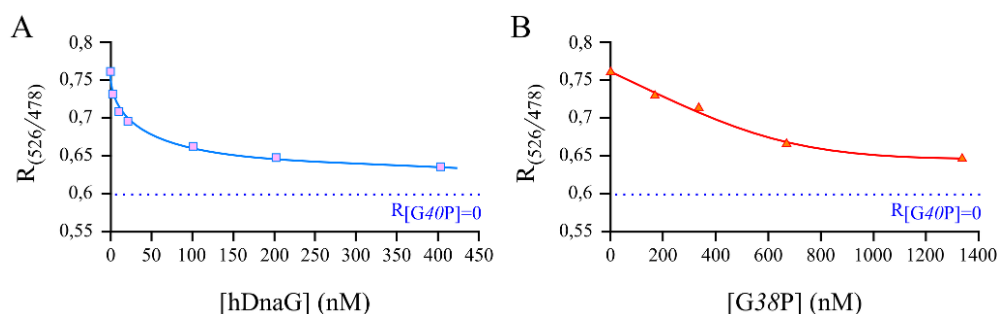


Figura 67. Ruptura del complejo hCFP39-hYFP39-G40P por acción de hDnaG y G38P.

Efecto de la concentración de hDnaG (A) y G38P (B) en la señal FRET producida por la mezcla hCFP39-hYFP39-G40P.

Puesto que anteriormente se había descrito que G38P es capaz de liberar a G40P del complejo que forma con G39P (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999), se realizaron ensayos en los que se confirmó que G38P ejercía un efecto negativo en la señal de FRET producida por el complejo hCFP39-hYFP39-G40P (Figura 67 B). A medida que la concentración de G38P

aumentaba se ocasionó un descenso progresivo de la fluorescencia asociada a efecto FRET, si bien la concentración de G38P requerida fue mayor que la que se precisó con DnaG.

4.8 Inhibidores de G40P.

Puesto que se disponía de una buena preparación de G40P, se decidió emplearla para testear la acción de posibles inhibidores de la actividad helicasa (Xu *et al.*, 2001).

4.8.1 Inhibición de la actividad ATPasa de G40P.

Con el fin de identificar los determinantes químicos responsables de la inhibición de G40P se realizó un estudio comparando el efecto de distintos poliquétidos (α -rubromicina, β -rubromicina, γ -rubromicina, ω -rubromicina, heliquinomicina, purpuromicina y griseorrodina C; Figura 10) sobre su actividad ATPasa. Dentro del conjunto de curvas dosis-respuesta obtenidas se pueden distinguir dos grupos (Figura 68 A): uno es el de aquellas drogas que prácticamente no afectan a la actividad ATPasa de G40P, incluso a la concentración mas alta (α -rubromicina y β -rubromicina) y otro está constituido por los compuestos químico que sí que inhiben claramente la actividad ATPasa. El mayor efecto inhibitorio sería el de la griseorrodina C, seguido de cerca del efecto de la purpuromicina; el efecto de las tres restantes es muy similar y menor (γ -rubromicina, ω -rubromicina y heliquinomicina). A este respecto, una concentración de griseorrodina C de 30 μ M produjo una reducción del 50 % de la actividad ATPasa de G40P. La pre-incubación de G40P con estos compuestos intensificó su efecto inhibitorio (Figura 68 B), salvo en el caso de la α -rubromicina, manteniéndose el orden relativo. Así, la griseorrodina C

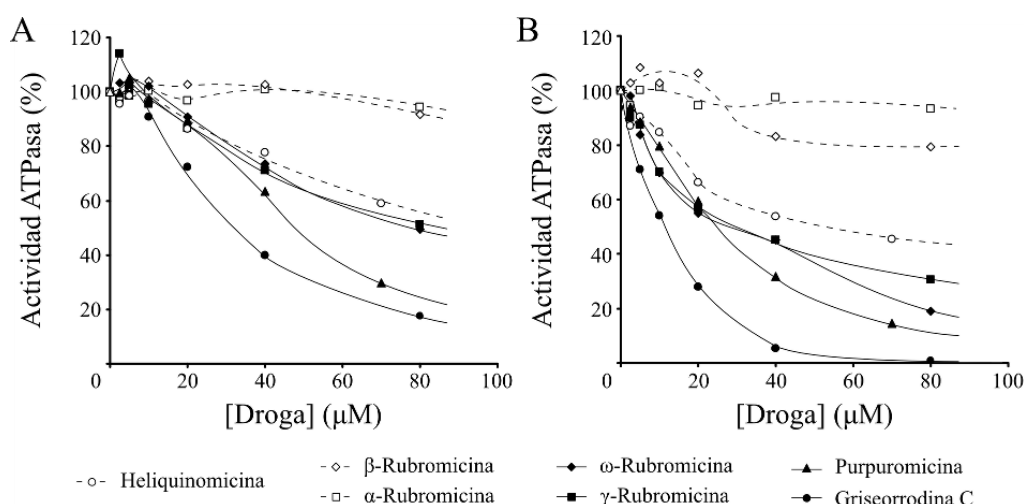


Figura 68. Efecto de distintas drogas en la actividad ATPasa de G40P.

A) Las reacciones ATPasa, que contenían las concentraciones indicadas de cada droga y ATP (200 μ M), se iniciaron con la adición de G40P (35 nM). **B)** En este otro caso G40P fue pre-incubado con las distintas drogas y posteriormente la reacción se inició con la adición de ATP (ver la sección “Materiales y métodos”).

seguía siendo la droga con un mayor efecto, de manera que bajo esas condiciones una concentración de 10 μM fue suficiente para reducir el valor de la actividad ATPasa a la mitad.

4.8.2 Efecto de la griseorrodina C en la cinética de la actividad helicasa de G40P.

El estudio de la cinética de la actividad de un enzima en presencia de diferentes concentraciones de un inhibidor puede proporcionar información sobre el modo de acción de este último (por ejemplo, si su acción inhibitoria es competitiva o no competitiva). Desafortunadamente, dado que G40P no se ajusta a un modelo cinético del tipo Michaelis-Menten el análisis de los datos es limitado (puesto que se precisa determinar el modelo concreto de reacción, que en este caso es mucho más complicado). G40P, como ATPasa, presenta un comportamiento cinético complejo donde la comunicación entre las distintas subunidades juega un papel muy importante. En este sentido, G40P experimenta inhibición por sustrato (Figura 12 y Figura 18) (Mesa, Alonso y Ayora, 2006) y estimulación en presencia de ADNcs (Figura 17) (Mesa, Alonso y Ayora, 2006; Ayora *et al.*, 2002a). G40P, en ausencia de inhibidor, presenta una actividad que aumenta hasta llegar a un máximo a una concentración de 50 μM de ATP, a partir de la cual se produce una disminución de la actividad ATPasa (Figura 69), que se hace más evidente a concentraciones mayores de ATP (Figura 18). Este efecto se hace incluso más pronunciado en presencia de ADNcs (Figura 18). Como consecuencia de esto, el efecto inhibitorio de la droga empleada se mezcla con el efecto inhibitorio del propio sustrato, lo que dificulta la interpretación cinética de la reacción que tiene lugar. En cualquier caso, la actividad ATPasa de G40P en presencia de griseorrodina C (que es el compuesto que un mayor efecto inhibitorio presentaba) se ve reducida claramente, con la característica de que la forma de la

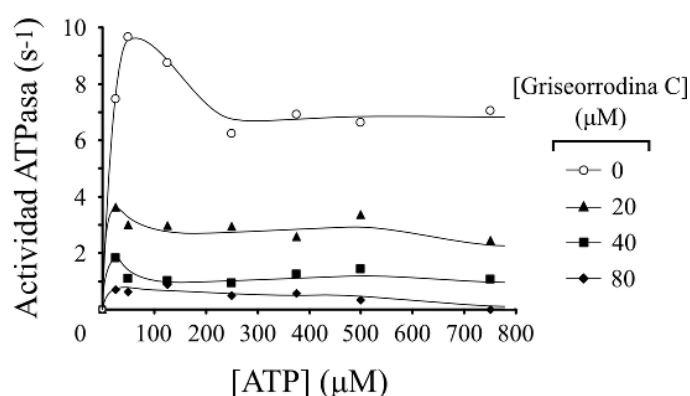


Figura 69. Cinética de la actividad ATPasa de G40P en presencia de griseorrodina C.

En la gráfica se muestra el valor de la actividad helicasa de G40P (35 nM), como velocidad inicial, alcanzado a distintos valores de concentración de ATP y en presencia de distintas concentraciones de griseorrodina C.

curva cinética parece conservarse a distintas concentraciones de griseorrodina C (Figura 69). En principio, puesto que la inhibición no puede ser superada simplemente incrementando la concentración de sustrato, el compuesto griseorrodina C no puede ser considerado como un inhibidor competitivo puro.

4.8.3 Disminución de la inhibición en presencia de ADNcs.

Dado que la actividad final de G40P es la separación de cadenas de ADN, la actividad helicasa, se decidió investigar cuál era el efecto del ADNcs en la inhibición de la actividad ATPasa propiciada por las drogas utilizadas. En los ensayos realizados se empleó una concentración de 1,25 μM d(pT)₃₀ (37,5 μM nucleótidos) y griseorrodina C y purpuomicina como inhibidores, puestos que fueron los que mostraron un mayor efecto. En ausencia de ADNcs y presencia de DMSO (sin droga) la velocidad inicial máxima fue de 10 s^{-1} , siendo 4 s^{-1} en ausencia de DMSO. Esta diferencia se debe a la introducción de DMSO en las reacciones (siempre a una concentración final de 5 %), como disolvente de las distintas drogas. Probablemente una solución con componentes hidrofóbicos u orgánicos favorezca el desarrollo de esta actividad de G40P, al igual que hacen el glicerol y la ASB incluidos en la mezcla de reacción. Este efecto hace que la diferencia de la actividad ATPasa en presencia y ausencia de ADNcs se vea reducida en presencia de DMSO (Figura 18 y Figura 70).

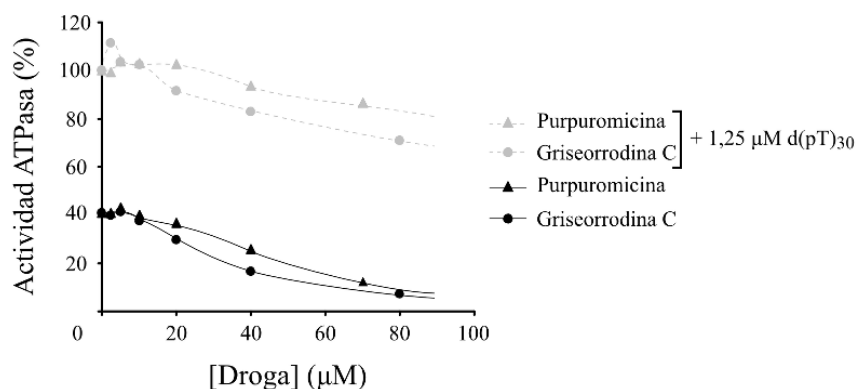


Figura 70. Inhibición en presencia de ADNcs de la actividad ATPasa de G40P.

El 100 % de la actividad ATPasa representa la actividad de G40P (35 nM) en presencia de ADNcs y en ausencia de droga (pero con 5 % DMSO).

Sorprendentemente el efecto inhibitorio de los compuestos griseorrodina C y purpuomicina en la actividad ATPasa de G40P se vio reducido en presencia de ADNcs, aunque no totalmente eliminado (Figura 70). En cualquier caso se puede apreciar el solapamiento de dos efectos, uno positivo, la activación alostérica por ADNcs, y uno negativo, la acción inhibitoria de la droga.

4.8.4 Inhibición de la actividad helicasa de G40P.

A la luz de los resultados anteriores, el siguiente y definitivo paso fue analizar el efecto de las diversas drogas en la actividad helicasa de G40P (Figura 71). De nuevo, griseorrodina C, acompañada a cierta distancia por purpuromicina, fue el compuesto que produjo una mayor inhibición, a una concentración de 0,6 μM fue capaz de reducir la actividad helicasa en un 50 %. La cuantía de su efecto la separaba claramente del resto de drogas. En general, los resultados reflejan un efecto mayor en la actividad helicasa que en la actividad ATPasa, salvo en los casos de la α -rubromicina, β -rubromicina y heliquinomicina, en los que se produjo el efecto contrario, una estimulación de la actividad helicasa (al menos a las concentraciones relativamente bajas de droga examinadas, a concentraciones mayores heliquinomicina y β -rubromicina si tienen un efecto inhibitorio en la actividad ATPasa). Si se considera el orden de mayor a menor inhibición en la actividad helicasa, se puede observar que se conserva con respecto a lo que ocurre con la actividad ATPasa (mayor efecto con griseorrodina C, que disminuye con purpuromicina, γ -rubromicina y ω -rubromicina), lo que podría indicar que la base del mecanismo de inhibición se conserva para ambas actividades. Esto no sería extraño si tenemos en cuenta que la actividad helicasa depende directamente de la unión e hidrólisis de ATP.

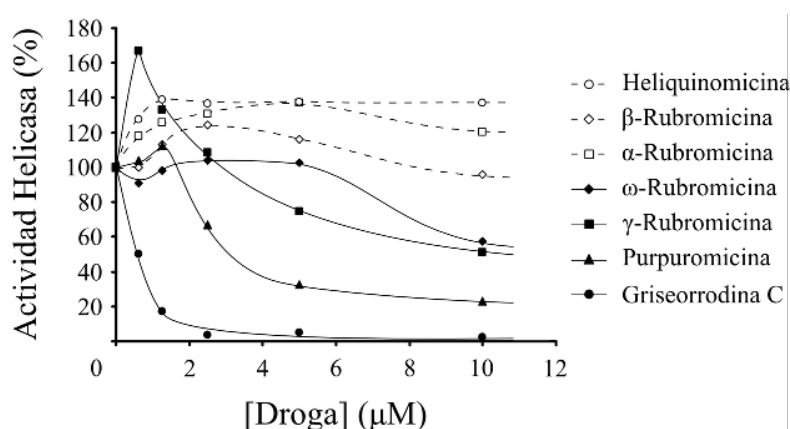


Figura 71. Efecto de las distintas drogas en la actividad helicasa de G40P.

G40P (35 nM hexámero) se incubó con el sustrato sh0 (0,2 nM), en presencia de ATP (200 μM) y de las drogas indicadas. El 100 % de la actividad representa la actividad helicasa de G40P en ausencia de inhibidor.

5. Discusión

5.1 Papel del dominio amino terminal de G40P.

Podríamos diferenciar distintas asociaciones de tipo actividad-estructura dentro del hexámero de G40P o de cualquier helicasa del tipo DnaB, que se han puesto de manifiesto a lo largo de la exposición de los resultados obtenidos con el mutante G40PΔN109. El dominio carboxilo terminal (DCT) ocuparía un lugar central dado que en él reside la actividad ATPasa y presenta los sitios de unión a ADN, sin embargo para que la proteína pueda ser activa las distintas subunidades deben estar dispuestas en el anillo de una manera específica, puesto que los sitios de unión e hidrólisis de ATP están formados por la contribución de dos subunidades contiguas (Singleton *et al.*, 2000). Lo mismo ocurre con los sitios de unión a ADN, estos deben estar localizados hacia el canal central del hexámero y disponerse de una manera específica que permita la interacción con el ADN y la continuidad de este contacto mientras se produce el desplazamiento de la helicasa (Yu *et al.*, 1996a; Itsathitphaisarn *et al.*, 2012) (Enemark y Joshua-Tor, 2006; Thomsen y Berger, 2009). La secuencia de conexión entre los dos dominios principales parece jugar un papel muy importante en este posicionamiento relativo de las diferentes subunidades dentro del anillo, sobre todo la parte que directamente contacta con el dominio carboxilo terminal de la subunidad adyacente (Guo, Tabor y Richardson, 1999a; Singleton *et al.*, 2000; Toth *et al.*, 2003; Figura 13). Esta región concreta de la proteína limita la libertad de movimiento de unas subunidades con respecto a otras, aún conservándose un cierto grado de libertad que permite que se puedan adquirir diferentes conformaciones, siempre y cuando estas sean compatibles con el mantenimiento del anillo cerrado. La importancia de esta parte de la proteína queda perfectamente reflejada en el caso de la helicasa RepA del plásmido RSF1010, que carece de dominio amino terminal y cuya actividad no tolera el cambio de los aminoácidos de la pequeña secuencia de conexión análoga que conecta una subunidad con otra adyacente (Ziegelin *et al.*, 2003). Si bien el resto de la secuencia de enlace y el dominio amino terminal (DNT) se asocian para constituir un anillo, en principio aislado del anillo constituido por los dominios ATPasa (Figura 72), probablemente su presencia e interacción constriñe y regula también la conformación que adopta el conjunto del hexámero (Bailey, Eliason y Steitz, 2007; Itsathitphaisarn *et al.*, 2012; Strycharska *et al.*, 2013). También este anillo de los DNTs sirve de punto de anclaje para la interacción con otras proteínas, como por ejemplo la primasa DnaG (Bird *et al.*, 2000; Bailey, Eliason y Steitz, 2007; Wang *et al.*, 2008), que a su vez podrían por medio de este anillo regular las conformaciones posibles del hexámero y su actividad (Chintakayala *et al.*, 2008; Strycharska *et al.*, 2013).

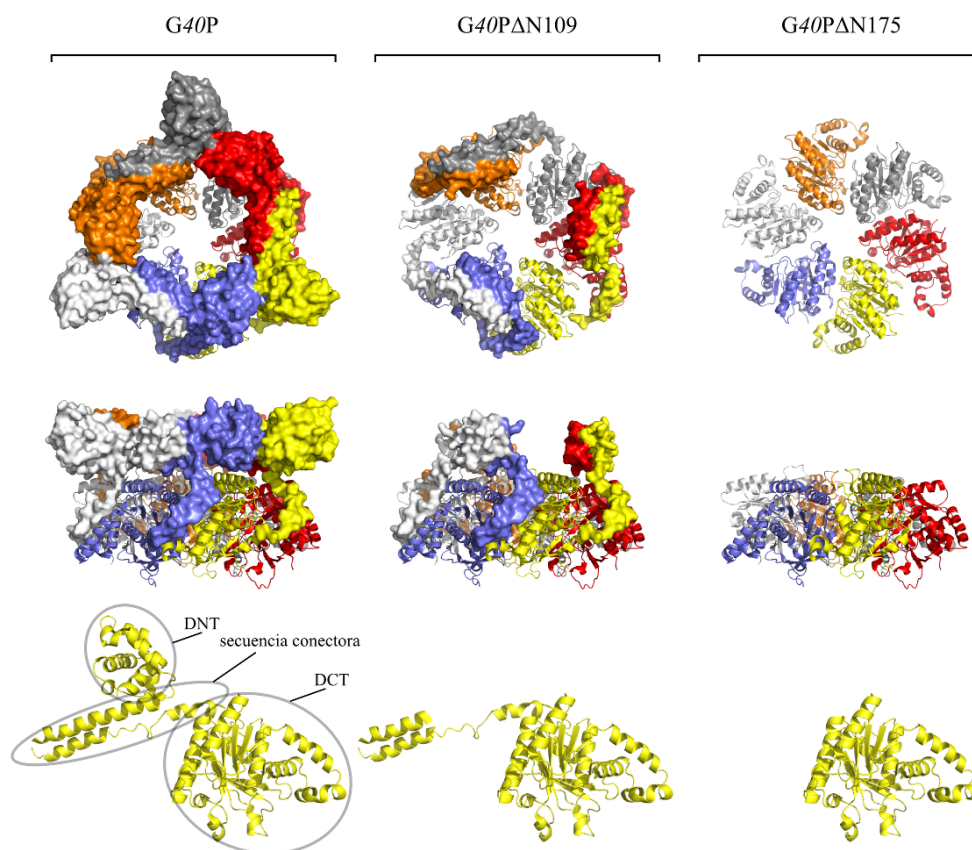


Figura 72. Modelos estructurales de las construcciones *G40PΔN109* y *G40PΔN175*.

En la figura se representan la estructura de *G40P* y los modelos, derivados de esta, de los mutantes de delección *G40PΔN109* y *G40PΔN175*. Por claridad se muestran distintas orientaciones de las estructuras, que se agrupan en vista frontal del hexámero (parte superior de la figura; donde puede observarse el orificio central del hexámero por el que debe pasar el ADNcs), vista lateral del hexámero (parte intermedia de la figura; donde puede verse el apilamiento del anillo que incluye los DNTs sobre el anillo de los DCTs) y vista de una de las subunidades (parte inferior de la figura; donde se detallan los distintos dominios). Cada una de las subunidades del hexámero se muestra en un color y mientras que los DCTs se representan mediante el esquema de su estructura secundaria (hélices, bucles y láminas beta), los DNTs y la secuencia conectora se representa mediante su superficie molecular, para diferenciar claramente ambas partes.

Con el fin de comparar *G40P* y *G40PΔN109* en el contexto de estas relaciones entre dominios se tomaron las estructuras publicadas de DnaB (Bailey, Eliason y Steitz, 2007) y de la propia *G40P* (Wang *et al.*, 2008) y se obtuvieron modelos estructurales de las construcciones de delección hechas a partir de *G40P* (Figura 72). Como ya se ha comentado los DNTs de *G40P* constituyen un anillo, junto con parte de la secuencia conectora, que se organiza en forma de un trímero de dímeros, llevándose a cabo parte de los contactos entre dímeros mediante los propios

DNTs (Biswas y Tsodikov, 2008). Frente a esta disposición característica, G40PΔN109 que carece de los DNTs, únicamente podría formar dímeros aislados mediante parte de la secuencia conectora, por lo que no se constituiría un segundo anillo cerrado paralelo al anillo de los dominios carboxilo terminal (Figura 72). La menor estabilidad de G40PΔN109 se podría correlacionar con la desaparición de este segundo anillo, que supone una interacción adicional entre las seis subunidades de la helicasa, que en este caso queda reducida a una interacción limitada entre dímeros. Esto podría suponer una mayor desestabilización del hexámero, que podría manifestarse con un incremento en la tendencia a la apertura del anillo o en el caso más extremo a la disociación parcial o total de subunidades. Los ensayos de gel filtración realizados con G40PΔN109 mostraron su mayor inestabilidad y su disociación en dímeros (Figura 14). En el caso de G40PΔN175 la proteína ya no dispone ni siquiera de la parte de la secuencia conectora que permite la conexión directa entre subunidades adyacentes, por lo que resultaría normal que sea completamente inactiva. Estos modelos estructurales también se podrían analizar a la luz de los resultados obtenidos en los estudios de microscopía electrónica (Figura 28). La mayor representatividad de la forma C_6 en el caso de G40PΔN109 podría asociarse en gran parte a que el dominio amino terminal sería el principal determinante que permite diferenciar las distintas conformaciones. Esto se correspondería con las estructuras, mencionadas anteriormente, de G40P y DnaB, donde es tal dominio el que confiere la simetría C_3 al sobresalir sobre el dominio carboxilo terminal (Figura 72). Sin embargo la presencia de simetría C_3 , a pesar de la ausencia del dominio amino terminal, puede darse ya que de hecho se han publicado estructuras de DnaB en las que los dominios carboxilo terminal se disponen con tal tipo de simetría (Bailey, Eliason y Steitz, 2007). Lo que si que resulta sorprendente es la presencia de complejos con siete subunidades, pues esto potencialmente puede alterar en gran medida las características del complejo (Figura 28). Tal vez se podría relacionar con la menor actividad helicasa de G40PΔN109 a pH 7,5 con respecto a pH 6,5 (Figura 25), aunque también habría que tener en cuenta la presencia de la actividad de hibridación de cadenas (Figura 36 y Figura 37). En cualquier caso, se han descrito previamente otras proteínas de la familia DnaB que pueden dar lugar a este tipo de complejos con siete subunidades, de hecho existe una estructura cristalográfica de T7gp4 que es un heptámero (Toth *et al.*, 2003). Parecería ser un estado natural en T7gp4, tal vez involucrado en el proceso de cargado en el ADNcs (Crampton *et al.*, 2006); en este caso el heptámero de T7gp4 no une ADN. La helicasa mitocondrial humana parece ser que también presenta un equilibrio entre hexámero y heptámero (Ziebarth *et al.*, 2010). RuvB también presenta dos formas C_6 y C_7 (Miyata *et al.*, 2000). La helicasa replicativa MCM de *Methanobacterium thermoautotrophicum* puede formar también heptámeros, si bien la forma activa es el hexámero (Yu *et al.*, 2002; Shin, Heo y Kelman, 2009;

Gómez-Llorente *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006; Jenkinson *et al.*, 2009). Otra ATPasa capaz de formar heptámeros es la chaperona ClpB (Kim *et al.*, 2000). En cualquier caso, esta capacidad de G40PΔN109 para formar complejos de siete subunidades parece estar totalmente reprimida en G40P, por lo que no se le podría asignar ninguna funcionalidad natural. Lo que sí que se pone de manifiesto es que al alterarse el anillo de los DNTs se introduce inestabilidad y la suficiente flexibilidad en la helicasa como para que el complejo albergue una subunidad adicional. Si bien no queda claro cual es el vínculo entre el polimorfismo cuaternario y la funcionalidad de la proteína, se ha propuesto que las transiciones conformacionales que puede experimentar el anillo de los DNTs y la secuencia conectora condicionan el comportamiento de las helicasas tipo DnaB (Strycharska *et al.*, 2013).

Otro aspecto importante es cómo este segundo anillo puede afectar a la interacción y comunicación que se da entre las seis subunidades mediante el DCT. De hecho como se ha podido comprobar, la comunicación que se establece entre los distintos dominios ATPasa hace que se produzca un efecto de cooperación negativa o inhibición por sustrato cuando se suministran altas concentraciones de ATP (Ayora *et al.*, 2002a; Bird *et al.*, 2000). Efecto de cooperación negativa que se manifiesta tanto en la actividad ATPasa como en la actividad helicasa (Figura 18 y Figura 27, respectivamente). Este fenómeno pone de manifiesto que para poder obtener una actividad óptima, no todos los sitios de unión a ATP deben estar ocupados, lo que se forzaría al aumentar la concentración de ATP. Con más moléculas de ATP unidas por hexámero, se imponen unas conformaciones que entorpecen de alguna manera la hidrólisis del propio ATP y la actividad helicasa, probablemente porque se modifican las superficies de interacción entre las distintas subunidades. En este sentido se ha publicado una estructura de DnaB (*Geobacillus stearothermophilus*) en la que la saturación del hexámero con GDP-AIF₄ en presencia de ADNcs provoca la dislocación del anillo de los DCT, de manera que estos dominios no quedan dispuestos en el mismo plano (Itsathitphaisarn *et al.*, 2012). Esta estructura contrasta con otras publicadas anteriormente en las que se mantiene la continuidad del anillo de los DCTs (Singleton *et al.*, 2000; Toth *et al.*, 2003) (Bailey, Eliason y Steitz, 2007; Wang *et al.*, 2008). Otra estructura relacionada en la que no se mantiene un anillo hexamérico es la del dominio helicasa de la proteína T7gp4, en la que las distintas subunidades, que se encuentran uniendo todas dTTP (sustrato natural), se disponen formando una hélice continua (Sawaya *et al.*, 1999).

En cualquier caso, lo que queda patente con todas las estructuras mencionadas en este apartado es la gran libertad de conformación dentro del anillo del hexámero de la que disponen los dominios carboxilo terminal de este tipo de proteínas. En este contexto, el dominio amino

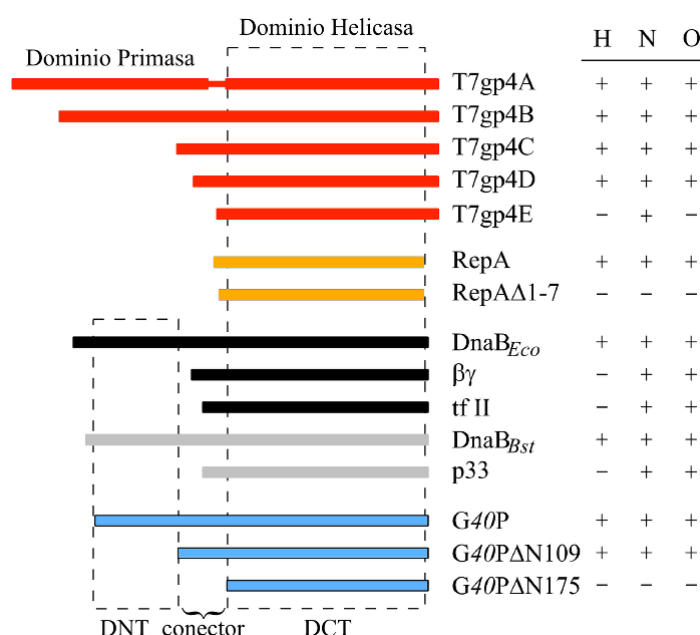


Figura 73. Las actividades de distintos mutantes de delección de helicasas tipo DnaB.

Se representan a escala los distintos dominios y partes de las secuencias de las proteínas indicadas. Los dominios amino terminal y carboxilo terminal se señalan como DNT y DCT respectivamente. Como actividades se indican la actividad helicasa (H), actividad de hidrólisis de nucleótidos trifosfato (N) y la capacidad para oligomerizar como hexámeros (O); con + y - se denota la capacidad de tales proteínas para desarrollar las actividades indicadas. Los distintos mutantes de delección se agrupan en función de la proteína origen: la helicasa-primasa **T7gp4** [(Bird *et al.*, 1997); (Sawaya *et al.*, 1999); (Guo, Tabor y Richardson, 1999b); (Toth *et al.*, 2003)], la helicasa **RepA** [(Xu *et al.*, 2000); (Niedenzu *et al.*, 2001); (Ziegelin *et al.*, 2003)], **DnaB** de *E.coli* (Biswas, Chen y Biswas, 1994); (Biswas y Biswas, 1999a); (Biswas y Biswas, 1999b); (Nakayama *et al.*, 1984a)], **DnaB** de *Bacillus stearothermophilus* (Bird *et al.*, 2000) y **G40P** [(Ayora *et al.*, 2002a); (Mesa, Alonso y Ayora, 2006)].

terminal y la secuencia de conexión entre los dos dominios contribuirían a limitar esa libertad, al constituir el mencionado anillo adicional dispuesto sobre los DCTs (Figura 72). Además se ha publicado que, en el caso de la proteína DnaB de *Aquifex aeolicus*, este anillo que incluye los DNTs puede alternar entre al menos dos conformaciones que afectan al comportamiento de la helicasa y a la interacción con otras proteínas, ATP y ácidos nucleicos (Strycharska *et al.*, 2013). Por ello la ausencia del DNT en G40PΔN109 podría afectar a muy distintos aspectos de su funcionalidad como helicasa. La disminución abrupta de la actividad ATPasa en G40PΔN109, en ausencia de ADNcs, podría verse producida por el aumento de la libertad de disposición relativa de los DCTs al no estar presentes los DNTs, lo que dificultaría que dos subunidades contiguas se dispusieran de la manera oportuna para constituir un sitio de unión de ATP capacitado para llevar a cabo la reacción de hidrólisis. Este incremento en la libertad de movimiento y asociación entre subunidades contiguas podría explicar también la mayor

inestabilidad del hexámero formado por G40PΔN109 (Figura 14). Sin embargo, en presencia de ADNcs la interacción de este con los dominios carboxilo terminales forzaría a que estos se dispusieran de una manera determinada, óptima para la formación de los sitios de unión de ATP, con lo que la actividad ATPasa del mutante pasa a ser únicamente la mitad de la de G40P (Figura 18). La misma explicación podría aplicarse a la actividad helicasa de G40PΔN109, aunque aquí la situación se complica al alterarse no solamente la cuantía de la actividad sino también las propias características de la actividad, como son la aparición de otra polaridad en el desplazamiento de la proteína (Figura 24) e incluso la manifestación de una actividad inversa a la esperada, una actividad de apareamiento de cadenas (Figura 32).

El comportamiento de G40PΔN109 en relación con la ausencia del DNT puede ponerse en perspectiva al compararse con el comportamiento de mutantes de delección de otras helicasas de la familia de DnaB (Figura 73). Todas estas proteínas presentan un DCT bastante conservado, el dominio helicasa, mientras que varían en la parte amino terminal. Así, mientras las proteínas DnaB y G40P presentan su característico DNT y la secuencia de conexión que lo une al dominio helicasa, RepA dispone tan solo de una corta secuencia que permite la interacción entre subunidades y T7gp4 presenta un dominio primasa, aunque mantiene la parte de la secuencia de conexión destinada a la interacción entre subunidades (Figura 13). El rasgo común entre todas estas proteínas es que cuando se elimina parte de la secuencia que conecta los DNTs y DCTs, sus actividades se empiezan a resentir. Esto pone de manifiesto la importancia de dicha región en la organización y actividad de estas helicasas. Tal es el caso de G40PΔN109, que aún presenta, aunque afectadas, las actividades de G40P, mientras que el mutante G40PΔN175 resulta ser totalmente inactivo (Figura 73).

5.2 La polaridad de la actividad helicasa de G40PΔN109.

El mutante G40PΔN109, carente del DNT de G40P, se ha caracterizado como una helicasa hexamérica bidireccional, aunque comparativamente los valores de sus actividades son menores que los de G40P (Figura 16, Figura 18 y Figura 24) y su estabilidad también se ve comprometida (Figura 14). En este sentido, el pH del medio en el que se encuentra la proteína parece afectar, tanto cuantitativa como cualitativamente, a su actividad helicasa (Figura 25). El DNT de G40P es por tanto necesario para mantener la actividad helicasa de manera óptima y a su vez restringirla a una única polaridad, la necesaria para el avance de la horquilla de replicación y la acción de las polimerasas asociadas. Si bien este dominio de G40P no parece ser estrictamente necesario para el desarrollo de ninguna de las actividades de la proteína, puesto que G40PΔN109 es funcional como ATPasa (Figura 17 y Figura 18), helicasa (Figura 24) y a la

hora de unir ADNcs (Figura 15 y Figura 16), sí que se precisa cuando se trata de discriminar a que tipo de sustrato se une la proteína y que tipo de polaridad se exhibe en el desplazamiento sobre tal sustrato.

En este contexto, G40PΔN109 al no disponer de los DNT probablemente tiene menos constricciones y por lo tanto mayor libertad en la disposición relativa de los dominios ATPasa, pudiendo flexibilizar la forma en que el hexámero se une al ADNcs y diversificar las transiciones que dan lugar al desplazamiento de la proteína a lo largo del ADN. Este comportamiento podría dar cuenta de la pérdida de la capacidad de discriminación en la unión a los brazos de ADNcs de una horquilla de replicación artificial, como queda reflejado en los ensayos de protección del ADN a la degradación por nucleasas (Figura 19). G40PΔN109 es así capaz de unirse a ambos brazos del sustrato y lo hace de una forma similar a la empleada por G40P, aunque esta última únicamente se une al brazo 5' de manera estable, manteniendo la forma en que esta protege la zona de cadena doble adyacente (Figura 20). Así mismo, la capacidad del mutante para desarrollar su actividad helicasa tanto con polaridad 3'→5' como 5'→3' (Figura 23 y Figura 24) puede ser un reflejo del mayor grado de libertad del que dispondrían los DCTs, de manera que ahora pueden desplazarse sobre el ADN con una polaridad que G40P no puede desarrollar. El hecho de que los patrones de actividad a distintos valores de pH de ambas proteínas sean complementarios (Figura 25), podría estar señalando que G40PΔN109 puede tener actividad bajo unas condiciones en las que la acción de G40P se encuentra fuertemente restringida con el fin de limitar la aparición de actividades que se considerarían aberrantes en el contexto de la replicación del ADN.

Atendiendo a todos los resultados obtenidos, referidos a la actividad de G40P y G40PΔN109, se ha propuesto un modelo de acción para explicar las diferencias de polaridad que ambas proteínas presentan (Figura 74). Este modelo se basa en la división de la polaridad de la actividad helicasa en dos eventos separados: la orientación de la proteína en su interacción inicial con el ADN y el sentido del desplazamiento de la proteína con respecto a dicho ADN. G40P y G40PΔN109, en su actividad helicasa con polaridad 5'→3' (Figura 74A), se unirían al brazo 5' de una horquilla de replicación y mediante la unión e hidrólisis de ATP orquestarían unos cambios conformacionales dentro del hexámero que darían lugar al intercambio de los sitios de unión a ADN y al desplazamiento con la susodicha polaridad 5'→3'. Según el modelo presentado, para explicar la polaridad 3'→5' que G40PΔN109 es capaz de exhibir habría dos

alternativas. En una de ellas (Figura 74B), *G40P* Δ N109 se une al ADNcs con una orientación opuesta a la de *G40P* y empleando sus mismas transiciones conformacionales dentro del anillo es capaz de desplazarse con una polaridad 3'→5'. La otra alternativa consiste en que *G40P* Δ N109 se una con la misma orientación que *G40P* al ADN, pero al revertir el sentido de los cambios conformacionales que tienen lugar, logre moverse con una polaridad 3'→5' (Figura 74C). Aunque no se recoge en estos modelos, obviamente, *G40P* Δ N109 también podría desarrollar su actividad helicasa 5'→3' uniéndose con una orientación invertida a la de *G40P* y a su vez desplazarse al realizar los cambios conformacionales en el sentido inverso al que emplea *G40P* (en el modelo presentado equivaldría a la opción B pero en el sentido inverso, bastaría con cambiar el sentido de la flecha horizontal en la Figura 74B). Estos cambios

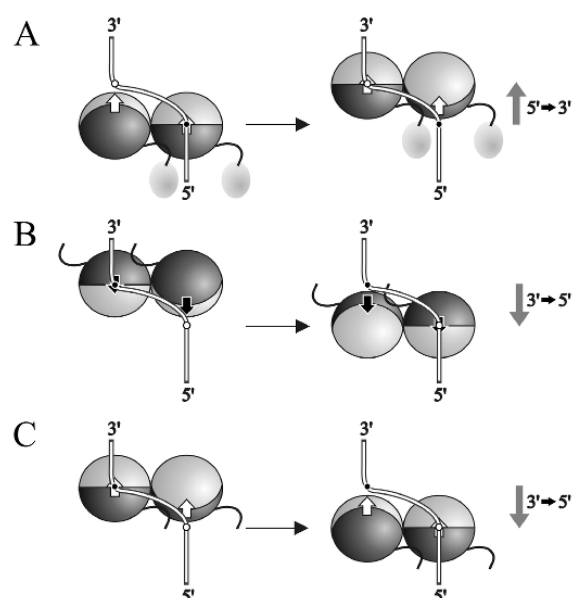


Figura 74. Modelo del desplazamiento sobre ADNcs de *G40P* y *G40P* Δ N109.

Representación de la unión de ambas helicetas a ADNcs y su movimiento sobre él. El ADNcs se ha dibujado como una barra blanca, indicándose sus dos extremos. Por claridad, únicamente se muestran dos subunidades del anillo de la heliceta, que rodearía al ADN. Cada subunidad se representa mediante una esfera grande de dos colores (empleados para especificar la polaridad propia de la proteína) que representa el dominio carboxilo terminal, una esfera pequeña que representa el dominio amino terminal (ausente en *G40P* Δ N109) y un pequeño segmento que las une, que simboliza la secuencia de enlace entre ambos dominios, y que contacta parcialmente con la subunidad contigua. Las distintas subunidades pueden girar unas respecto a otras dependiendo del estado del sitio de unión a ATP, esto hace que los bucles de unión a ADN (representados por flechas) se dispongan a distintas alturas, lo que en última instancia genera el movimiento del hexámero al alternarse la unión a dicho ADNcs entre subunidades consecutivas. El color de los bucles de unión a ADN depende de la polaridad con la que se unen al ADN (flechas blancas, polaridad 5'→3', el DCT se orienta hacia el extremo 3' del ADNcs; flechas negras, polaridad 3'→5', el DCT se orienta hacia el extremo 5' del ADNcs). Las flechas verticales a la derecha indican la polaridad del desplazamiento.

conformacionales estarían directamente relacionados con el orden en el que se produce la hidrólisis dentro del anillo de la helicasa hexamérica (Singleton *et al.*, 2000; Crampton, Mukherjee y Richardson, 2006). Con todo esto habría que considerar que, o bien G40PAN109 ha perdido su capacidad para discriminar inequívocamente la orientación con la que se une al ADN, o bien se ha degenerado el ciclo que dentro del anillo dicta las transiciones conformacionales que desembocan en la generación de un movimiento con una polaridad definida. Otra posibilidad consistiría en considerar que G40PAN109 haya perdido totalmente la capacidad de discriminar la orientación en la unión a ADN y la capacidad para desplazarse con una determinada polaridad, lo que haría que su movimiento fuera totalmente aleatorio. Sin embargo en el caso más extremo de este último escenario habría sido imposible cuantificar su actividad helicasa y separar las dos distintas polaridades que es capaz de desarrollar (Figura 23 y Figura 24). En el esquema se representa, por simplicidad, la unión de una única subunidad al ADN en cada momento, pero esto no es así, se ha visto que distintas subunidades podrían unirse simultáneamente dentro del anillo, aunque obviamente debe haber una transición entre subunidades que dejan de unir ADN y otras que pasan a unirlo (Crampton, Mukherjee y Richardson, 2006; Singleton *et al.*, 2000; Itsathitphaisarn *et al.*, 2012; Enemark y Joshua-Tor, 2006; Thomsen y Berger, 2009).

Teniendo en cuenta los ensayos de protección de ADN presentados (Figura 19 y Figura 20), que podrían indicar que G40PAN109 mantiene el mismo tipo de orientación en el ADN sustrato e igual protección de la zona de cadena doble que G40P, se podría dar un mayor peso a la opción B del modelo (Figura 74 B), aunque las protecciones no requieren necesariamente una especificidad en la orientación, únicamente que la proteína se disponga de una manera similar. Posteriormente a la presentación de este modelo, se resolvieron las estructuras de la helicasa E1 (Enemark y Joshua-Tor, 2006) unida a ADNcs y del terminador de la transcripción Rho (Thomsen y Berger, 2009) unido a ARN y un estudio comparativo mostró que ambas proteínas son capaces de unirse con la misma orientación al sustrato de ácido nucleico pero exhiben polaridades opuestas de desplazamiento al cambiar el sentido en el que se produce la hidrólisis dentro del anillo que constituyen los dominios ATPasa (Thomsen y Berger, 2009). En este modelo de acción las subunidades disponen los bucles de unión a ADN en forma de espiral, de manera que el giro relativo de las subunidades producido por la unión e hidrólisis de ATP hace que tales bucles se vayan desplazando sobre el ácido nucleico. Es por tanto la forma en que coordinan las distintas subunidades la hidrólisis y los movimientos relativos que llevan a cabo unas respecto de otras lo que determina la polaridad del avance, manteniéndose la manera en que se interacciona con el ácido nucleico. Sin duda se trata de proteínas dispares, que de hecho pertenecen a distintas familias de helicasas (E1 es del tipo SF3 y Rho es del tipo SF5; Singleton,

Dillingham y Wigley, 2007), y por lo tanto el caso no es totalmente extrapolable a la situación vista con G40P y G40PAN109 (SF4), pero sí que podría sugerir que el modelo C presentado para la actividad de G40PAN109 es factible (Figura 74 C). Más recientemente se ha determinado la estructura de la proteína DnaB (SF4) de *G. stearothermophilus* en contacto con ADNcs (Itsathitphaisarn *et al.*, 2012), poniéndose de manifiesto que tal vez las helicasas de la familia SF4 funcionen de una manera distinta a como lo hacen las helicasas E1 y Rho. La característica más llamativa de esta estructura, como ya se comentó anteriormente, es que el anillo de los DCTs está abierto y las subunidades no se encuentran en el mismo plano. Sin embargo la integridad del hexámero se mantiene mediante el anillo formado por los DNTs y las secuencias conectoras. A partir de esta estructura se ha propuesto un modelo en el que el avance de la helicasa sobre el ADNcs se produce por la migración neta de una de las subunidades en cada ciclo de hidrólisis de ATP, en vez de por el desplazamiento sucesivo de los bucles de unión a ADN que se ha propuesto en el caso de E1 y Rho (Itsathitphaisarn *et al.*, 2012). Si bien la funcionalidad que se le ha querido atribuir a esta estructura hace que se la considere como un paso en el proceso de desplazamiento sobre el ADN, una interpretación alternativa podría ser que se corresponde más bien con un paso intermedio en el proceso de cargado de la helicasa en el ADN, debido a que el anillo de los DCTs se encuentra abierto, paso imprescindible para que la helicasa hexamérica haga pasar el ácido nucleico por su orificio central.

Otra estructura de un homólogo de DnaB, DnaC de *Geobacillus kaustophilus*, muestra que el anillo formado por los DNTs y la secuencia conectora puede unir ADNcs, proponiéndose que tal interacción dirigiría el ADN hacia la primasa DnaG que interacciona con dicho anillo (Lo *et al.*, 2009). Previamente ya se había descrito que el hexámero de DnaB presenta dos sitios de unión a ADNcs, uno fuerte cerca del dominio amino terminal y otro más débil en el dominio carboxilo terminal (Bujalowski y Jezewska, 1995; Jezewska, Rajendran y Bujalowski, 1998). La alteración de uno de estos dos sitios en G40PAN109 podría ser la responsable en parte de la menor afinidad de G40PAN109 por ADNcs (Figura 15 y Figura 16). Así mismo, también podría afectar a la polaridad del desplazamiento sobre el ADNcs si consideramos que el sitio de unión localizado en el anillo de los DNTs condiciona la forma en que se producen los cambios conformacionales en el anillo de los DCTs. Y finalmente, si tal sitio de unión está implicado en el proceso inicial de cargado en el ADN su ausencia podría afectar a la orientación en la que el hexámero se carga sobre el ácido nucleico. En el caso de la proteína hexamérica FtsK, implicada en la segregación del ADN y en la división celular, la polaridad en el desplazamiento sobre ADNcd viene determinada por un dominio adicional que reconoce secuencias específicas (Löwe *et al.*, 2008; Crozat y Grainge, 2010; Massey *et al.*, 2006). En este sentido resultaría

tentador decir que el DNT de *G40P* confiere la polaridad a su actividad helicasa, pero por el momento no se dispone de los suficientes datos.

Sea cual sea el mecanismo real detrás de la actividad de *G40P* Δ N109, lo que sí que resulta ser cierto es que evolutivamente se ha desarrollado en torno a las helicasas hexaméricas un dominio ATPasa apto para la unión de ADNcs muy versátil, siendo capaz de desarrollar distintos tipos de polaridad de desplazamiento y a la vez lo suficientemente elaborado como para restringir la posibilidad de que se den dos polaridades simultáneamente, que obviamente no tendría sentido sin un mecanismo adicional de control. Queda abierta la posibilidad de que una proteína que interaccione y afecte al dominio amino terminal de *G40P* pueda regular la polaridad de *G40P*, cosa que por ejemplo podría resultar útil cuando la horquilla de replicación se detiene (Gabbai y Mariani, 2010; Masai, Tanaka y Kohda, 2010), en procesos de reparación de ADN (Constantinesco *et al.*, 2004) o en el propio proceso de replicación mediada por recombinación del bacteriófago SPP1 (Martínez-Jiménez, Alonso y Ayora, 2005; Zecchi *et al.*, 2012; Seco *et al.*, 2013). De momento únicamente se conoce una helicasa hexamérica que presente de forma natural ambas polaridades, la proteína HerA de arqueas termófilas, implicada en procesos de reparación de ADN por recombinación homóloga (Constantinesco *et al.*, 2004; Iyer *et al.*, 2004; Quaiser *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008b). Lo que sí que se han descrito son helicasas bipolares no relacionadas con DnaB o helicasas hexaméricas. Tal es el caso de la proteína PcrA de *Staphylococcus aureus*, que pertenece a la superfamilia 1 de helicasas (SF1) y es capaz de desplegar actividad helicasa con polaridad 5'→3' y 3'→5' en sustratos de ADN con una determinada estructura, que es lo que en última instancia condiciona su polaridad (Anand y Khan, 2004; Ruiz-Masó *et al.*, 2006). El complejo RecBCD, que también pertenece al grupo SF1, actúa también como una helicasa bipolar, pero aquí las distintas polaridades recaen en distintas subunidades: RecB, 3'→5' y RecD, 5'→3' (Singleton *et al.*, 2004; Spies *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2013). En este caso, se ha sugerido que la alteración en la polaridad de RecD con respecto a RecB está relacionada con un cambio en el desplazamiento sobre el ADN y no en la orientación con la que interacciona con el mismo (sería el mismo caso que el de las helicasas El y Rho; Wigley, 2007; Pugh, Wu y Spies, 2012). Otros ejemplos de helicasas bipolares descritas son PfdH60 (Pradhan, Chauhan y Tuteja, 2005), Pfh45 (Pradhan y Tuteja, 2007), PDH47 (Vashisht *et al.*, 2005) y la proteína D2 del fago T5 (Wong, Sayers y Sanders, 2013).

El hecho de que *G40P* Δ N109 pueda desarrollar una actividad helicasa con polaridad 3'→5' difumina el límite entre las helicasas con el dominio carboxilo terminal tipo RecA, que tienen polaridad 5'→3', y las helicasas tipo AAA+, que presentan polaridad 3'→5'. O lo que es lo mismo, acerca en cuanto a actividad a las helicasas replicativas procariotas como DnaB a las

eucariotas como MCM (Leipe, Aravind y Koonin, 1999; Barry *et al.*, 2007; McGeoch *et al.*, 2005; Sanchez-Berrondo *et al.*, 2012).

5.3 La actividad de apareamiento de cadenas de G40PΔN109.

Tan inesperado como detectar la polaridad adicional de G40PΔN109 resultó ser descubrir la actividad de hibridación de cadenas que el mutante de delección era capaz de desplegar (Figura 32) y que enmascaraba parcialmente su actividad helicasa al ser completamente opuestos los resultados de su acción (Figura 36). Tal actividad se pudo asignar a la proteína G40PΔN109 ya que se veía inhibida en presencia de G39P (Figura 33 A), que interacciona específicamente con ella (Figura 41 C). Se podría pensar que G39P, en el proceso de cargado de G40P/G40PΔN109 en el ADNcs que sirve de sustrato, inhibe el primer contacto que las helicasas tienen con el ADN. Esto lo podría conseguir imponiendo una determinada conformación al hexámero y logrando ocultar de alguna manera las zonas del primer contacto de la helicasa con el ADN. Resulta llamativo que el ATP inhiba también esta actividad (Figura 33 B), incluso para valores altos de concentración de ATP en los que la actividad helicasa, que podría a su vez enmascararla, se ve inhibida (Figura 27). En este sentido, el ATP podría estar induciendo unas determinadas conformaciones en el hexámero que hicieran que G40PΔN109 se comportara más como una helicasa/ATPasa que como una proteína capaz de aparear cadenas de ADNcs. En relación con esto el ATP podría estar estabilizando la integridad del hexámero, evitando su apertura o disgregación; de hecho la propia G40P es más estable en presencia de ATP y Mg^{2+} (Ayora *et al.*, 2002a; Ayora, Stasiak y Alonso, 1999). El hecho de que tal actividad se dé en ausencia de ATP, mientras que la actividad helicasa lo requiere, y que los rangos de pH óptimos de dichas actividades no se correspondan (Figura 25, Figura 36 y Figura 37), indicarían que probablemente los estados en los que se encuentra la proteína para desarrollar tales actividades contrapuestas son distintos. En cualquier caso, G40P no exhibe esta actividad de hibridación de cadenas (Figura 35), lo que le otorgaría a su DNT un rol preventivo a la hora de evitar que dicha actividad tenga lugar. Como ya se ha comentado anteriormente la presencia del DNT otorga mayor estabilidad al hexámero al poderse constituir un trímero de dímeros de dichos dominios y de la secuencia conectora, que forma un anillo adicional en la helicasa (Figura 72).

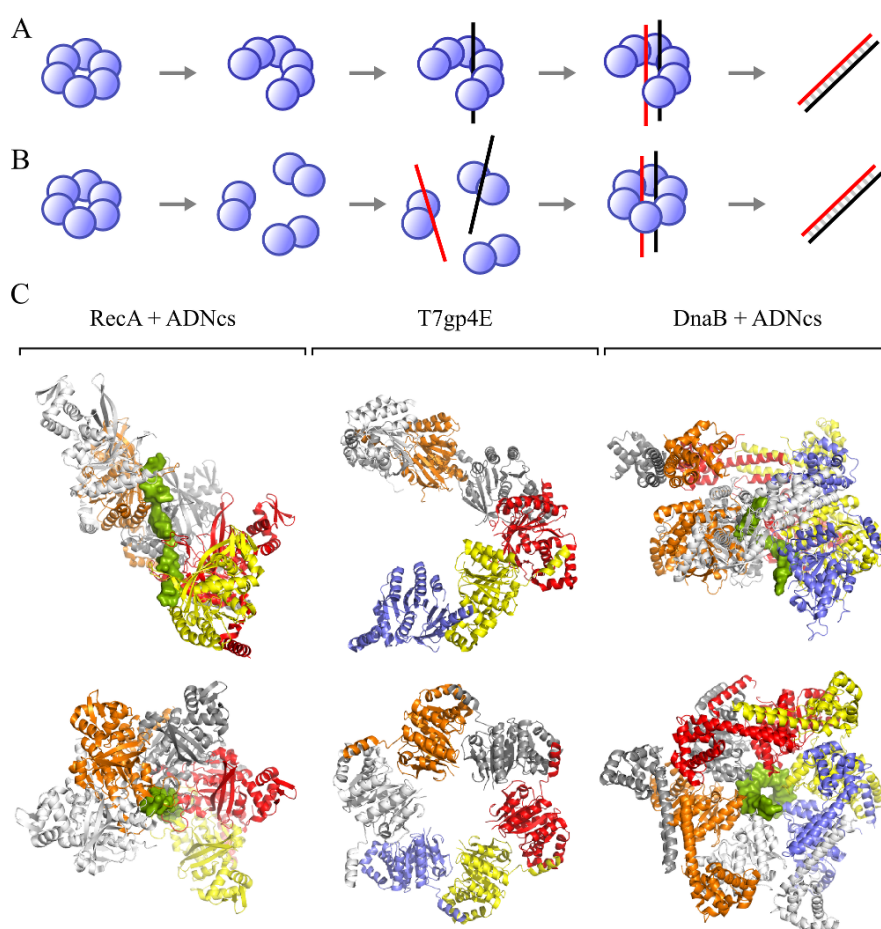


Figura 75. Mecanismos propuestos para la hibridación de ADN por mediación de G40PΔN109.

A) Apareamiento de cadenas complementarias de ADN inducido por la apertura del hexámero de G40PΔN109. **B)** Hibridación de ADNcs promovida por el proceso de desestabilización del hexámero de G40PΔN109, generación de dímeros y nueva formación de hexámeros. **C)** Vistas superiores (parte superior de la figura C) y vistas laterales (parte inferior) de las estructuras de RecA con ADNcs (Chen, Yang y Pavletich, 2008), T7gp4E (Sawaya *et al.*, 1999) y DnaB con ADNcs (Itsathitphaisarn *et al.*, 2012); obtenidas respectivamente de los siguientes archivos pdb: 3CMW, 1CR1 y 4ESV. Cada subunidad se muestra en un color y el ADNcs se representa por su superficie molecular en verde.

Una vez detectada por primera vez esta actividad de G40PΔN109 el primer impulso fue compararla con la actividad de su homólogo estructural la proteína RecA (Yu y Egelman, 1997; Kowalczykowski *et al.*, 1994; Bell, 2005; Cox, 2007). Como se pudo comprobar en los ensayos (Figura 34), una de las muchas actividades de RecA es el apareamiento de hebras complementarias de ADNcs estimulado por ATP (Weinstock, McEntee y Lehman, 1979; VanLoock *et al.*, 2003). RecA resultó ser más activa que G40PΔN109 y además no presentaba inhibición por ATP, sino todo lo contrario. Cabe destacarse, sin embargo, que en estos sencillos

experimentos RecA también era capaz de acelerar la hibridación de cadenas complementarias en ausencia de ATP, al igual que G40PΔN109. La forma activa de RecA la constituyen filamentos helicoidales en los que el ADNcs queda capturado (Figura 75 C). Como el canal interno de este filamento puede albergar más de una hebra de ADNcs, RecA cataliza la hibridación de cadenas al exponer de manera adecuada el ADN para que se realicen búsquedas por complementariedad de secuencia. Cabría preguntarse por lo tanto si G40PΔN109 podría emplear un mecanismo similar. El hexámero de G40P y G40PΔN109 debe abrirse para que se produzca la introducción del ADNcs en su orificio central (Egelman *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1996a; Jezewska *et al.*, 1998; Ahnert, Picha y Patel, 2000; Picha, Ahnert y Patel, 2000), esto supone que se deben abrir los dos anillos, el constituido por los DCTs y el formado por los DNTs y la secuencia conectora. Por lo tanto, al menos transitoriamente, se debe producir una estructura abierta similar, aunque sea remotamente, a la del filamento de RecA (Figura 75). Puesto que se ha demostrado que G40PΔN109 puede albergar ADN de cadena doble mientras se desplaza sobre un sustrato para desarrollar su actividad helicasa (Figura 38), podría considerarse la posibilidad de que se emplease un mecanismo similar al empleado por RecA. Esto supondría que el hexámero debería abrirse y permanecer abierto el tiempo suficiente como para que una vez aceptada una molécula de ADN, la expusiese de manera óptima y pudiese interaccionar con otra que resultara ser complementaria, favoreciéndose así el apareamiento de cadenas (Figura 75 A). La estructura cristalográfica de una construcción de la helicasa hexamérica T7gp4 (Figura 75 C), que contiene el dominio carboxilo terminal y parte de la secuencia conectora (Figura 73), muestra que dicha proteína es capaz de formar filamentos continuos que recuerdan a los de RecA (Sawaya *et al.*, 1999). Tal vez G40PΔN109 pueda formar transitoriamente estructuras similares a esta última que favorezcan la exposición del ADNcs que pueda contener. La estructura de la proteína DnaB de *G. stearothermophilus* muestra que la interacción con ADNcs puede provocar la apertura del anillo de los dominios carboxilo terminal, mientras que el anillo de los dominios amino terminal permanece cerrado (Figura 75). Obsérvese en la figura como la subunidad azul se encuentra desplazada considerablemente hacia abajo, lo que provoca la rotura del anillo. Al carecer de DNTs, G40PΔN109 podría ser más propenso a presentar tal tipo de estructura por un tiempo más prolongado, o incluso ser más sensible a disgregarse debido a su mayor inestabilidad (Figura 14). Considerando esta última posibilidad se propone un mecanismo alternativo en el que la disociación de G40PΔN109 en dímeros y la interacción de estos con ADNcs podría dar lugar al apareamiento de cadenas una vez que los dímeros volvieran a interaccionar entre sí para reconstruir el hexámero (Figura 75 B). Otro posible mecanismo podría depender de la existencia de sitios de unión a ADNcs distintos de los empleados en la actividad helicasa.

Se ha descrito la existencia de helicasas capaces de llevar a cabo apareamiento de cadenas, como es el caso de la proteína humana HARP (Yusufzai y Kadonaga, 2008), que parece estar implicada en procesos de estabilización de horquillas de replicación detenidas y reparación de daño en el ADN durante la replicación (Driscoll y Cimprich, 2009; Ghosal, Yuan y Chen, 2011). Otros ejemplos son la proteína AH2 (Yusufzai y Kadonaga, 2010), RECQ5beta (García *et al.*, 2004), la helicasa del síndrome de Bloom (Cheok *et al.*, 2005), PcalRG (Jamroze *et al.*, 2013), StoHjm (Li *et al.*, 2008) e incluso la helicasa hexamérica mitocondrial humana TWINKLE (Sen *et al.*, 2012). Para esta última se propone que dada su actividad podría estar implicada en el proceso de iniciación de la replicación del ADN mitocondrial mediado por recombinación o en el proceso de reparación de ADN durante la replicación. En este contexto, la actividad de apareamiento de cadenas descrita para G40PAN109 podría resultar útil en el proceso de replicación mediada por recombinación propia del fago SPP1, siempre que hubiese alguna manera de que G40P sacara a la luz dicha actividad, tal vez mediante la interacción de otra proteína con su dominio amino terminal. Por todo ello, resultaría interesante analizar la actividad de hibridación de cadenas de G40PAN109/G40P empleando otros sustratos de ADN distintos a las horquillas de replicación empleadas aquí.

En este contexto de actividades que G40P no debería presentar, resulta llamativo considerar que se ha propuesto que la helicasa replicativa DnaB original evolucionó a partir de una duplicación de una RecA ancestral (Leipe *et al.*, 2000; Leipe, Aravind y Koonin, 1999). Cabría la posibilidad por tanto de que G40PAN109 exhibiese una actividad críptica que se encuentra fuertemente inhibida en G40P, heredada directamente de RecA. Al igual que ocurría con la polaridad de la actividad helicasa, G40P ha desarrollado mecanismos que le permiten evitar esta actividad de hibridación de cadenas, que únicamente se manifiesta cuando se elimina el DNT. Por ello, este dominio resulta ser importante no solo desde un punto de vista estructural, sino que es esencial para mantener reprimidas actividades que G40P podría desarrollar y que son contraproducentes para su función en replcación. El dominio amino terminal contribuye por lo tanto a la afinación óptima de las actividades de G40P.

5.4 Modelo de acción de G39P en el cargado de G40P sobre ADNcs.

La proteína G39P constituye el ejemplo perfecto de cómo los virus, plásmidos y transposones consiguen simplificar, economizar y optimizar distintos procesos, proporcionando en ocasiones incluso vías alternativas que les permiten sacar partido de las funciones del huésped y que suministran una visión complementaria y tremendamente útil a la que proporciona el estudio directo de las funciones celulares (Weigel y Seitz, 2006) (del Solar *et al.*, 1998). En este caso, G39P mediante el cargado de G40P en el origen de replicación del genoma

de SPP1, localizado y abierto por G38P, consigue atraer a las polimerasas de *B. subtilis* que interaccionan con G40P. Y esto se consigue con una proteína que es la mitad del tamaño de su análogo funcional, el cargador estándar de DnaB de *E. coli*, la proteína DnaC (14 frente 28 kDa). Estructuralmente la principal característica de G39P consiste en estar organizada en dos regiones, una parte globular plegada en la región amino terminal y una segunda mitad intrínsecamente desordenada (Figura 39 y Figura 40) (Bailey *et al.*, 2003b; Bailey *et al.*, 2003a). Como se ha comprobado experimentalmente esta región desordenada es la que emplea G39P para interaccionar con G40P (Figura 41 y Figura 44). El hecho de que la zona de interacción forme parte de una región intrínsecamente desordenada puede reportar ventajas como son el economizar la longitud de la secuencia necesaria para generar la interfaz de contacto, favorecer la interacción mediante la adaptación y el aumento de especificidad, proporcionar flexibilidad tanto en la interacción como en la conexión al dominio plegado y prevenir la agregación cuando la región desordenada no está implicada en interacción alguna (Liu y Huang, 2014; Oldfield y Dunker, 2014; Schlessinger *et al.*, 2011). Igualmente, dada la extremada sensibilidad a proteólisis de esta región de G39P se podría plantear la hipotética existencia de un tipo de regulación de la interacción con G40P controlada por la degradación de la zona de contacto.

Teniendo en cuenta la organización de G39P en el cristal (Figura 39 E y F), donde los monómeros de la proteína se disponen en forma de hélice mediante el contacto mutuo de las regiones plegadas amino terminal, y el hecho de que se pudo observar polimerización de la proteína mediante ensayos de entrecruzamiento con glutaraldehído (Figura 48), se propone que G39P es capaz de oligomerizar sobre G40P. Esto supondría que los contactos que se establecen entre las partes amino terminal de la proteína son lo suficientemente débiles como para que G39P tienda a comportarse como monómero en solución (Figura 56). Pero sin embargo, cuando es secuestrada por el hexámero de G40P mediante el uso de la región intrínsecamente desordenada, la concentración local de G39P aumentaría por lo que se favorecería por cooperación la interacción de más subunidades. Este comportamiento sería compatible con todo lo observado en los ensayos de FRET (Figura 58 y Figura 60), donde se requiere que varias copias de las fusiones de G39P-GFP interaccionen con G40P y que los dominios amino terminal de G39P permanezcan próximos entre sí. Así, se propone que cuando G40P se satura con G39P esta última tiende a establecer los contactos que se han observado en el cristal, de manera que seis G39P se dispondrían en forma de hélice sobre el hexámero de G40P (Figura 76 A). Teniendo en mente entonces la estructura del complejo DnaB·DnaC en la que se produce la rotura del anillo de la helicasa (Arias-Palomo *et al.*, 2013; Figura 8 B), se propone que G39P podría forzar la apertura del hexámero de G40P, preparándolo para ser cargado en ADNcs (Figura 76 A). Como puede observarse en la figura, la hélice de seis subunidades de G39P se

ajustaría a la también hélice observada en la estructura de la proteína *G40P* Δ N129 (Wang *et al.*, 2008), quedando entre ambas la región desordenada de *G39P*, que en ese momento podría encontrarse parcialmente plegada. Esta última estructura abierta del mutante de delección de *G40P* es muy similar a la estructura abierta de *DnaB* en presencia de ADNcs comentada anteriormente (Figura 75 C) (Itsathitphaisarn *et al.*, 2012). El hecho de que para obtener entrecruzamiento por UV con ADNcs se necesiten ambas regiones de *G39P* (Figura 53), apoyaría esta idea, en el sentido de que se precisa la interacción con *G40P* y además se requiere la región amino terminal de *G39P*, probablemente porque es la clave para formar un hexámero abierto sobre la helicasa y prepararla para interaccionar con ADNcs.

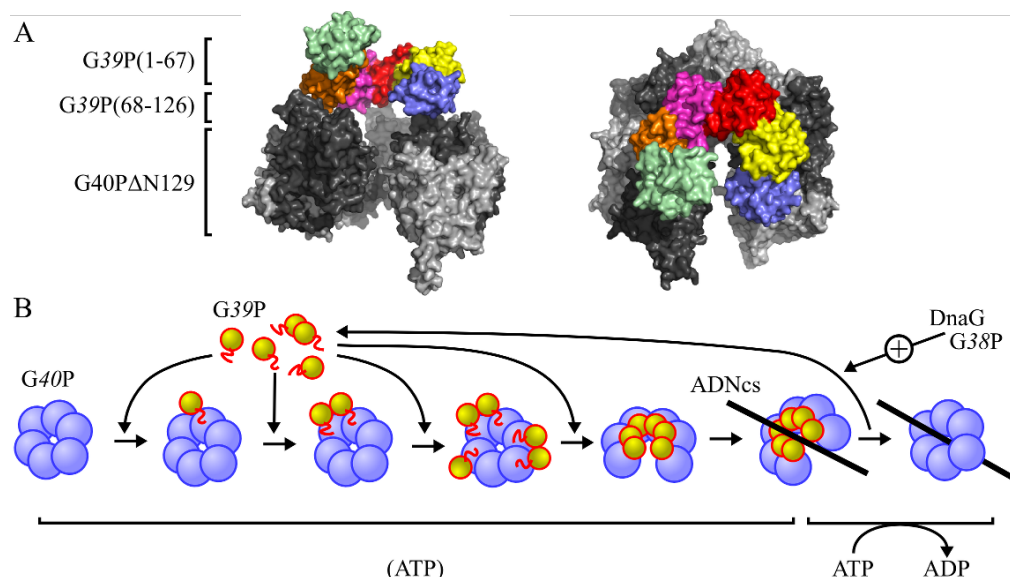


Figura 76. Modelo del proceso de cargado de *G40P* en ADNcs mediado por *G39P*.

A) Modelo de la interacción de *G39P* con *G40P*, donde se ha empleado un hexámero de los dominios amino terminal de *G39P* (cada subunidad se muestra en un color), manteniendo los contactos vistos en el cristal (Bailey *et al.*, 2003b) y un hexámero de la estructura de *G40P* Δ N129 (las subunidades se muestran en distintos tonos de gris; Wang *et al.*, 2008). La región intrínsecamente desordenada de *G39P* (aminoácidos 68-126) se dispondría entre ambas hélices. Se muestra una visión lateral (izquierda) y una frontal (derecha) del complejo. **B)** Modelo del cargado de *G40P* regulado por *G39P* sobre ADNcs (ver texto).

Frente a los tres modelos existentes que tratan de explicar la separación del cargador *DnaC* del complejo *DnaB*·*DnaC* (Figura 7), se propone un modelo para la liberación de *G39P* del complejo *G40P*·*G39P* y el cargado de *G40P* sobre ADNcs (Figura 76 B). Según este modelo la helicasa *G40P* interaccionaría progresivamente con *G39P* hasta que una vez saturada se promovería la interacción de los dominios amino terminal de *G39P*, por lo que se induciría la

apertura del anillo de *G40P* y la disposición de las distintas subunidades en forma de hélice. Durante todo este proceso el ATP no sería imprescindible pero sí que optimizaría la interacción entre *G39P* y *G40P*. Esto se ha podido verificar mediante los ensayos de protección de *G39P* frente a proteólisis (Figura 44 y Figura 45), en los que la protección mediada por *G40P* era óptima en presencia de ATP, y los ensayos de entrecruzamiento con ADNcs por radiación UV (Figura 52), donde igualmente el ATP no era imprescindible, pero sí que optimizaba la reacción. También se ha podido comprobar por ensayos de retención de *G40P* en resina de nickel (Figura 64). Sin embargo los ensayos FRET mostraron que la oligomerización de las fusiones de *G39P*-GFP sobre *G40P* era estrictamente dependiente de la presencia e hidrólisis de ATP (Figura 62, Figura 63 y Figura 65). En este sentido, las fusiones *G39P*-CFP y *G39P*-YFP no se comportan como la proteína *G39P* nativa. Probablemente la presencia de la porción GFP hace que en ausencia de ATP las partes de *G39P* de los monómeros de estas fusiones no se puedan disponer de una forma adecuada para que se dé el máximo de transferencia de energía de resonancia, es decir no quedan próximos entre sí. Sin embargo, en presencia de ATP los cambios de conformación inducidos en *G40P* por la hidrólisis del nucleótido podrían forzar la reorganización y reorientación de los dominios amino terminal de *G39P* lo que induciría la asociación entre ellos y la disposición más adecuada de las partes GFP de las fusiones para que se produzca de forma óptima el fenómeno FRET. Por lo tanto el ATP no sería imprescindible en la interacción entre *G39P* y *G40P*, pero sí que la favorecería por el mecanismo que se ha descrito, que requeriría la hidrólisis de ATP. Una vez que el anillo de *G40P* se ha abierto al estar totalmente unido a *G39P*, su actividad ATPasa quedaría inhibida (Figura 42 A) (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999). Cuando se empleó la proteína hA39N73 para verificar la inhibición de la actividad ATPasa de *G40P* se pudo observar que su capacidad de inhibición era mucho menor que la de *G39P*, por lo que el dominio amino terminal de *G39P* es necesario para la inhibición óptima de tal actividad (Figura 42 B). Con ello se confirmaría el papel que se ha estado otorgando a esa parte de *G39P*: la inhibición total de la actividad ATPasa de *G40P* solo se daría cuando las partes amino terminal de *G39P* interaccionan entre sí y provocan la apertura e inhibición del hexámero.

El siguiente paso consistiría en la interacción inicial y efímera del complejo con el ADNcs. De alguna manera el anillo abierto de *G40P*-*G39P* es capaz de interaccionar con el ADN de forma que *G39P* contacta o queda muy próximo con él, como se ha verificado con los ensayos de entrecruzamiento por luz UV (Figura 49). Tal contacto, o proximidad, se podría establecer mediante el canal central visto en la disposición de la proteína en el cristal (Figura 39 E y F). Alternativamente la región intrínsecamente desordenada de *G39P* podría estar implicada en esta interacción transitoria (Vuzman y Levy, 2012), plegándose momentáneamente para

establecer contactos con el ácido nucleico sobre el que se llevará a cabo el cargado de G40P, pero precisándose siempre de la otra parte de G39P (Figura 53). De igual manera, en el caso del sistema de cargado de *B. subtilis* se ha propuesto que cuando DnaI, uno de los cargadores de la helicasa, interacciona con la helicasa DnaC pasa a exponer un sitio crítico de unión a ADNcs (Ioannou *et al.*, 2006). Una vez que se establece este primer contacto con el ADNcs algún tipo de transición se produce en el complejo G40P-G39P que hace que, mediante la hidrólisis de ATP, G40P quede definitivamente cargado y G39P se libere (Figura 76 B). Esta transición quedó confirmada en los ensayos de protección frente a proteólisis, en los que en presencia de ADNcs G39P dejaba de estar protegida por G40P solo si se podía hidrolizar ATP (Figura 44 y Figura 45). En este sentido, se propone que la presencia de ADNcs reactivaría a G40P y mediante la realización de ciclos de hidrólisis de ATP, que provocarían cambios conformacionales dentro del anillo, sería capaz de forzar la salida de G39P al romper los contactos que se establecen entre sus dominios amino terminal. Se trataría por lo tanto del proceso contrario, pero relacionado, al que se propuso para la necesidad de que se produzca hidrólisis de ATP en los ensayos FRET. Se ha propuesto que DnaC puede funcionar como un conmutador ATP-ADP, de manera que con su débil actividad ATPasa estimulada por DnaB y ADNcs podría hidrolizar ATP, lo que desencadenaría en última instancia su salida del complejo DnaC·DnaB (Figura 7 A; Davey *et al.*, 2002). G39P podría hacer algo parecido, pero careciendo de un sitio de unión e hidrólisis de ATP, se vale de la propia actividad ATPasa de G40P. La salida de G39P del complejo G40P·G39P en presencia de ADNcs fue verificada mediante experimentos de transferencia de energía de resonancia (Figura 66). Asimismo, se comprobó que la primasa DnaG tiene el mismo efecto (Figura 67 A), lo que corrobora resultados obtenidos en el sistema DnaB·DnaC·DnaG de *E.coli* (Makowska-Grzyska y Kaguni, 2010). De esta manera, con la interacción con DnaG se evitaría la interacción de G39P con una G40P ya implicada en el proceso de replicación. G38P también puede disociar G39P del complejo G40P·G39P (Figura 67 B), verificándose resultados previos (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999). Así, G38P interaccionaría con el origen de replicación de SPP1, desaparecería una región adyacente de ADN y podría interaccionar con el ADNcs (Figura 50), de modo similar a como lo hace DnaA (Mott *et al.*, 2008). G39P para poder cargar a G40P en esa región de ADN interaccionaría con G38P, lo que promovería la separación de parte de G38P del ADNcs, la liberación de G39P del complejo G40P·G39P y el cargado final de la helicasa (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999).

Esta transferencia, en la que G39P primero inhibe a G40P y después lo carga en el ADNcs, permite la optimización de la actividad helicasa de G40P (Figura 29 A), probablemente promoviendo una interacción favorable con el sustrato de ADN, así como la orientación y

disposición correcta del hexasomero en la horquilla de replicación. Si G39P, en los sustratos empleados, al controlar el cargado de G40P pudiese forzar de alguna manera que el estado inicial al desarrollo de la actividad helicasa fuera incompatible con la entrada del otro brazo de cadena sencilla en su canal central, estaría favoreciendo el desplazamiento de G40P sobre una única cadena sencilla de ADN y no sobre una cadena doble. Tendría por tanto un efecto de estimulación similar a la presencia de un brazo de cadena doble (Figura 23).

En presencia de G39P se precisa el DNT de G40P para que se pueda producir su cargado correcto en el ADNcs, sin él la actividad helicasa de G40PAN109 queda inhibida (Figura 29 B). Probablemente G39P impone una conformación determinada a G40PAN109, a la que no puede forzar a G40P por la presencia del anillo de los DNTs, de la que no logra recuperarse en presencia de ADNcs. O simplemente el mutante de delección no es capaz de interaccionar correctamente con el sustrato de ADN cuando interacciona con G39P. En este sentido, se ha propuesto que las transiciones conformacionales que experimenta el anillo de los DNTs son necesarias para el cargado correcto de DnaB en ADN por mediación de DnaC (Arias-Palomo *et al.*, 2013; Strycharska *et al.*, 2013). Tal vez G39P bloquea de una manera específica a G40P que puede ser revertida mediante la interacción con el ADN, paso en el que podría estar implicado el DNT al controlar las conformaciones que el anillo de DCT puede adoptar.

5.5 Acción de G39P en el cargado de G40P sobre ADNcd.

G40P también presentó una actividad inesperada, el cargado sobre ADN de cadena doble y el desarrollo de su actividad helicasa a partir de este (Figura 21, Figura 23 y Figura 30). G40P presenta una afinidad por ADNcd mucho menor que por ADNcs (Ayora *et al.*, 2002a), que es el comportamiento generalizado de las helicasas tipo DnaB, aunque existen casos como el de la helicasa DnaB de *Helicobacter pylori* que presenta una afinidad similar por ambos tipos de ADN (Nitharwal *et al.*, 2012). En este sentido puede ser que distintas helicasas presentes distintas preferencias según las funciones que lleven a cabo. En el caso de G40P, esta helicasa es capaz de unirse a regiones de doble cadena y llevar a cabo desde allí su actividad helicasa (Figura 20). El mutante G40PAN109 ni presenta esta actividad ni produce la protección de la zona de cadena doble (Figura 20), al menos a las concentraciones de proteína empleadas, lo que podría indicar que el DNT es necesario para la unión a ADNcd y el desarrollo de tal actividad helicasa atípica. Sin embargo, esta actividad es inhibida claramente por G39P (Figura 30 y Figura 31), que podría llevar a cabo una selección de los potenciales sustratos en los que cargar de manera óptima a G40P, rechazando las formas de doble cadena y priorizando horquillas de replicación. Si bien no se puede descartar que la actividad de cargado sobre ADNcd de G40P pueda tener alguna función, en presencia de G39P nunca tendría lugar, lo que permitiría impedir

el cargado de la helicasa en cualquier región de ADNcd del inmenso genoma de la bacteria huésped, localizando como diana principal las zonas de ADNcs señalizadas con G38P (Ayora, Stasiak y Alonso, 1999).

5.6 Herramienta FRET.

El sistema FRET desarrollado para evaluar la interacción entre G39P y G40P parece funcionar correctamente salvo por la dependencia estricta por ATP, que en el complejo G39P·G40P nativo no parece darse (Figura 62, Figura 63, Figura 64 y Figura 65). Convendría por tanto replantear el diseño de las fusiones G39P con las variantes de GFP, con el fin de obtener un sistema que se acerque más al comportamiento de las proteínas sin modificar. En este sentido el sistema se podría optimizar con versiones más modernas de la proteína GFP que resuelven parte de los problemas que pueden surgir al emplear estas técnicas (Piston y Kremers, 2007). Por ejemplo, se podría optar por el uso de mutantes puntuales que reducen la ya de por sí baja tendencia de GFP a formar dímeros (Zacharias *et al.*, 2002). También convendría probar distintas longitudes en la secuencia que conecta GFP y G39P, tratando de evitar que la parte que constituye la variante de GFP sea un estorbo para G39P a la hora de cumplir con sus funciones, aún a costa de sacrificar parte de la señal FRET al alejar los cromóforos. Estas construcciones, que en teoría podrían comportarse mas como la proteína G39P natural, permitirían por ejemplo testear el efecto de análogos de ATP no hidrolizables en la liberación de G39P inducida por la presencia de ADNcs. Tal vez el que comportamiento de las fusiones no sea exactamente igual al de G39P reflejaría el delicado mecanismo que se da dentro del complejo G40P·G39P y que gobierna la interacción y la liberación de G39P.

5.7 Inhibición de la actividad de G40P por griseorrodina C.

Del conjunto de compuestos químicos analizados como posibles inhibidores de la actividad helicasa de G40P la griseorrodina C resultó ser el que producía un efecto más dramático (Figura 71). Dada la similitud de las estructuras químicas de estos compuestos (Figura 10), se puede llevar a cabo un comparación de los elementos que resultan esenciales para la actividad inhibitoria de la griseorrodina C. Así, se puede comprobar que a medida que ciertos grupos químicos presentes en la griseorrodina C son sustituidos en otras drogas el efecto inhibitorio de estas va disminuyendo (Figura 77). La obtención de análogos naturales o sintéticos basados en la estructura de la griseordodina C o la purpuromicina permitiría tal vez incrementar aún más el efecto inhibitorio sobre G40P u otras helicasas. En este sentido, por ejemplo se han descrito otras variantes, griseorrodina G y griseorrodina A, que se diferencian de

Discusión

la griseorrodina C en los grupos químicos del anillo D (Figura 77; Eckardt, Tresselt y Ihn, 1978; Capecchi, de Koning y Michael, 2000).

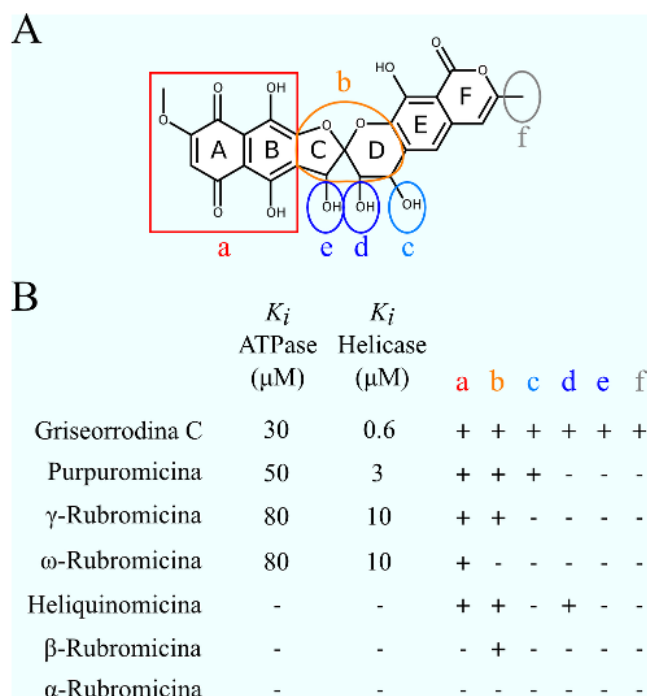


Figura 77. Relación entre la capacidad de inhibición y la estructura química de las drogas analizadas.

A) Representación de la estructura química del compuesto griseorrodina C y sus subestructuras más destacadas (a, porción naftoquinona; b, porción compuesto espiro; c y d, grupos hidroxilo ligados al anillo D; e, grupo hidroxilo unido al anillo C; f, grupo metilo del anillo F). **B)** Se detallan las constantes aparentes de inhibición (K_i) para las actividades helicasa y ATPasa de G40P. Esos datos se acompañan de una comparación estructural del compuesto griseorrodina C con el resto de poliquétidos empleados en este estudio (Figura 10). El símbolo (+) representa la presencia de las entidades químicas detalladas en la parte (A) de la figura (indicadas con letras minúsculas) y el símbolo (-) su ausencia. K_i representa la concentración de la droga que produce una disminución de la actividad de G40P en un 50 %. Los valores de K_i únicamente se muestran en los casos donde pueden ser calculados a partir de los datos presentados (bajas concentraciones de los compuestos).

El conjunto de los compuestos aquí analizados fueron en un principio identificados y aislados por su actividad biológica. Por ejemplo, la griseorrodina C es activa como antibiótico frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Eckardt, Tresselt y Ihn, 1978) y la purpuromicina se emplea para el tratamiento de infecciones vaginales (Trani *et al.*, 1997). Obviamente, esto indica que dentro de la célula deben existir una o varias dianas que son esenciales para su viabilidad, de ahí que posteriormente se hayan empleado en estudios de la inhibición de distintas enzimas de interés para la medicina. Ejemplos de ello son la inhibición de la transcriptasa reversa del VIH (Goldman *et al.*, 1990), la ADN polimerasa β (Mizushina *et*

al., 2000) y la telomerasa (Ueno *et al.*, 2000) por parte del grupo de las rubromicinas, o el efecto inhibitorio de la heliquinomicina en la helicasa MCM4/6/7 (Ishimi *et al.*, 2009; Sugiyama *et al.*, 2012). Todos estos son casos de enzimas que interaccionan con ADN y con nucleótidos trifosfato, al igual que en el caso de la inhibición de G40P por la griseorrodina C. Probablemente exista un mecanismo común en todos estos casos, con las subsiguientes especificidades de cada proteína que hacen que unas drogas sean más efectivas que otras.

G40P ve inhibida su actividad ATPasa principalmente por griseorrodina C y purpuromicina (Figura 68) por un mecanismo que parece no ser competitivo (Figura 69). Sin embargo este efecto se ve reducido en presencia de ADNcs, que estimula la actividad ATPasa de G40P. En el caso del estudio del efecto de la heliquinomicina sobre la helicasa MCM4/6/7 se ha descrito que este compuesto es capaz de unirse a ADN de cadena sencilla (Sugiyama *et al.*, 2012). Esta unión estabiliza a su vez la interacción de la helicasa con ADNcs, proponiéndose que este sea el mecanismo por el que se inhibe la actividad helicasa del complejo, que requeriría una interacción débil con ADNcs. Asimismo se describió que si bien la heliquinomicina inhibe la actividad ATPasa de MCM4/6/7 en presencia de ADNcs, en su ausencia no hay una inhibición significativa de dicha actividad (Ishimi *et al.*, 2009). Por el contrario, en el caso de la inhibición de la actividad ATPasa de G40P por griseorrodina C se produce la situación inversa, la actividad se ve fuertemente inhibida en ausencia de ADNcs (Figura 68) y solo hay una inhibición parcial en su presencia (Figura 70). En este sentido, la inhibición de la actividad helicasa de G40P parece ser independiente de la posible titulación de la droga por la presencia de ADNcs, por lo que los mecanismos de inhibición de la heliquinomicina y el de la griseorrodina D/purpuromicina deben ser distintos al actuar en distintas enzimas. Teniendo en cuenta la capacidad de la heliquinomicina para interaccionar con el ADNcs, podría darse el caso de que la interacción de la griseorrodina C/purpuromicina con ADNcs produjese una disminución de la inhibición al retirarse parte de la droga. En cualquier caso, la griseorrodina C es capaz de inhibir por sí sola la actividad ATPasa de G40P, por lo que al menos parte de la inhibición de la actividad helicasa viene directamente de dicho efecto. Dado que el desplazamiento sobre el ADN, y la consiguiente separación de cadenas, se ha propuesto que depende del orden en que se produce la hidrólisis (Singleton *et al.*, 2000; Enemark y Joshua-Tor, 2006; Thomsen y Berger, 2009), un efecto negativo que se produzca en la actividad ATPasa se puede ver amplificado en la actividad helicasa. Por otra parte, la interacción de la heliquinomicina con ADNcs podría explicar el efecto de estimulación de la actividad helicasa de G40P que tiene a bajas concentraciones (si bien a concentraciones más altas inhibe la actividad ATPasa en ausencia de ADNcs).

Discusión

Todo en su conjunto apunta a que este tipo de moléculas pueden tener una elevada especificidad, así, si bien la heliquinomicina no tiene un efecto importante en la actividad helicasa de G40P, sí que inhibe la del complejo MCM4/6/7 (K_i 2,4 μ M), a la vez que se ha

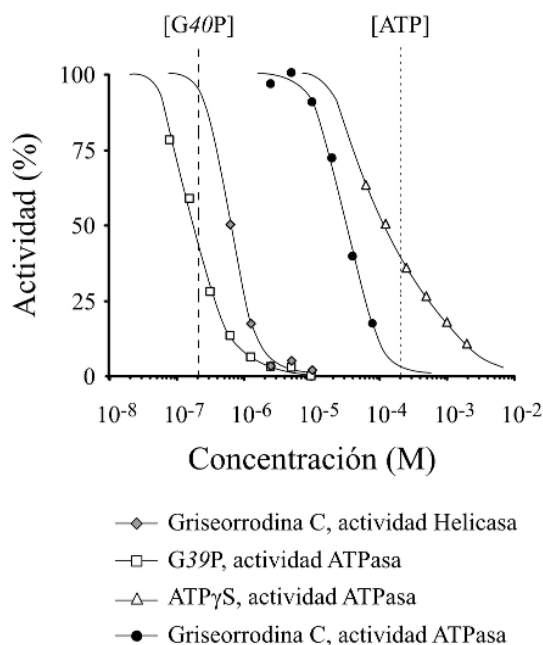


Figura 78. Comparación del efecto inhibitorio de distintas moléculas en la actividad de G40P.

Se muestran las curvas dosis-respuesta siguientes: G39P (concentración como monómeros) y su acción inhibitoria de la actividad ATPasa de G40P (K_i 0,19 μ M); inhibición de la actividad helicasa por griseorrodina C (K_i 0,6 μ M); inhibición de la actividad ATPasa por griseorrodina C (K_i 30 μ M); inhibición de la actividad ATPasa por ATPγS (K_i 125 μ M). Además se indican las concentraciones de G40P y ATP empleadas en los ensayos realizados (0,21 μ M monómeros y 200 μ M, respectivamente).

descrito que su efecto inhibitorio es mucho menor en las helicasas SV40 TAG y Werner (Ishimi *et al.*, 2009).

Si se compara la capacidad del compuesto griseorrodina C para inhibir la actividad ATPasa de G40P con el efecto que tiene G39P sobre esa misma actividad se constata que esta última proteína es mucho más potente como inhibidor (Figura 78). Pero claramente G39P es una molécula mucho más grande y compleja, que puede utilizar trucos como polimerizar sobre G40P y alterar así su conformación y comportamiento. Por otro lado, la capacidad de la griseorrodina C como inhibidor sí que es mayor que la de un inhibidor competitivo como es el ATPγS. De todas formas, la capacidad de inhibición de la actividad helicasa por parte de la griseorrodina C sí que se acerca más al efecto inhibitorio de G39P en la actividad ATPasa (Figura 78). En este sentido es como si se hubiera podido comprimir la capacidad de inhibición

de G39P en una molécula muchísimo más pequeña... pero obviamente G39P hace mucho más que simplemente inhibir la actividad ATPasa de G40P.

6. Conclusiones

Conclusiones

Las principales aportaciones del trabajo presentado en esta memoria se pueden concretar en los siguientes puntos:

1. Se ha desarrollado un sistema de purificación del complejo G40P-G39P que permite a su vez obtener ambas proteínas por separado.
2. El mutante de delección G40PΔN109, que carece del dominio amino terminal de G40P, es capaz de separar las hebras de sustratos de ADN de cadena doble con ambas polaridades, 5'→3' y 3'→5'. Su actividad helicasa de polaridad 3'→5' es inhibida por G39P.
3. G40PΔN109 presenta también una inesperada actividad de apareamiento de cadenas complementarias, que se inhibe en presencia de ATP o G39P.
4. Dado el comportamiento de la proteína G40PΔN109, se propone que el dominio amino terminal de G40P cumple un papel importante en la organización y en las transiciones conformacionales del anillo de los dominios ATPasa. Asimismo se propone que regularía la manera en la que la helicasa interacciona con el ADN.
5. G39P presenta una estructura organizada en dos módulos, uno plegado formado por su mitad amino terminal y otro intrínsecamente desordenado constituido por su mitad carboxilo terminal. G40P es reclutada por G39P mediante la interacción con esa región desordenada.
6. Se ha propuesto que cuando seis monómeros de G39P se disponen sobre el hexámero de G40P, las interacciones que tienen lugar entre sus dominios plegados les permiten adoptar una forma de hélice que fuerza la apertura del anillo de la helicasa G40P. De esta manera, el complejo queda preparado para la toma de contacto con ADN de cadena sencilla. Cuando la interacción de G40P con dicho ADN se culmina se produce la salida de G39P del complejo.
7. Asimismo, G39P es capaz de supervisar los sustratos a los que se une G40P, inhibiendo que pueda desarrollar su actividad helicasa desde su unión a ADN de cadena doble.
8. Se han dado los primeros pasos en el desarrollo de una herramienta molecular que permita examinar la interacción entre G40P y G39P mediante ensayos de transferencia de energía de resonancia (FRET).
9. Los compuestos griseorrodina C y purpuromicina actúan como inhibidores efectivos de las actividades ATPasa y helicasa de G40P.

7. Bibliografia

- AHNERT, P., PICHA, K.M. Y PATEL, S.S. 2000. A ring-opening mechanism for DNA binding in the central channel of the T7 helicase-primase protein. *The EMBO journal* **19**(13), 3418–27.
- ALONSO, J.C., LÜDER, G., STIEGE, A.C., CHAI, S., WEISE, F. Y TRAUTNER, T.A. 1997. The complete nucleotide sequence and functional organization of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *Gene* **204**(1-2), 201–212.
- ALONSO JC, TAVARES P, LURZ R, T.T. 2006. *Bacteriophage SPP1*. In: Calendar, R. (ed.), *The Bacteriophages*, p.
- ANAND, S.P. Y KHAN, S. A 2004. Structure-specific DNA binding and bipolar helicase activities of PcrA. *Nucleic acids research* **32**(10), 3190–7.
- ARIAS-PALOMO, E., O'SHEA, V.L., HOOD, I. V Y BERGER, J.M. 2013. The bacterial DnaC helicase loader is a DnaB ring breaker. *Cell* **153**(2), 438–48.
- AYORA, S., LANGER, U. Y ALONSO, J.C. 1998. *Bacillus subtilis* DnaG primase stabilises the bacteriophage SPP1 G40P helicase-ssDNA complex. *FEBS letters* **439**(1-2), 59–62.
- AYORA, S., STASIAK, A. Y ALONSO, J.C. 1999. The *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 G39P delivers and activates the G40P DNA helicase upon interacting with the G38P-bound replication origin. *Journal of molecular biology* **288**(1), 71–85.
- AYORA, S., WEISE, F., MESA, P., STASIAK, A. Y ALONSO, J.C. 2002a. *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 hexameric DNA helicase, G40P, interacts with forked DNA. *Nucleic acids research* **30**(11), 2280–9.
- AYORA, S., MISSICH, R., MESA, P., LURZ, R., YANG, S., EGELMAN, E.H. Y ALONSO, J.C. 2002b. Homologous-pairing activity of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 replication protein G35P. *The Journal of biological chemistry* **277**(39), 35969–79.
- BACHUR, N.R., YU, F., JOHNSON, R., HICKEY, R., WU, Y. Y MALKAS, L. 1992. Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents. *Molecular pharmacology* **41**(6), 993–8.
- BACHUR, N.R., LUN, L., SUN, P.M., TRUBEY, C.M., ELLIOTT, E.E., EGORIN, M.J., MALKAS, L. Y HICKEY, R. 1998. Anthracycline antibiotic blockade of SV40 T antigen helicase action. *Biochemical pharmacology* **55**(7), 1025–34.
- BAILEY, S., SEDELNIKOVA, S.E., MESA, P., AYORA, S., ALONSO, J.C. Y RAFFERTY, J.B. 2003a. Crystallization of the *Bacillus subtilis* SPP1 bacteriophage helicase loader protein G39P. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **59**(6), 1090–1092.
- BAILEY, S., SEDELNIKOVA, S.E., MESA, P., AYORA, S., WALTHO, J.P., ASHCROFT, A.E., BARON, A.J., ALONSO, J.C. Y RAFFERTY, J.B. 2003b. Structural analysis of *Bacillus subtilis* SPP1 phage helicase loader protein G39P. *The Journal of biological chemistry* **278**(17), 15304–12.
- BAILEY, S., ELIASON, W.K. Y STEITZ, T. A 2007. Structure of hexameric DnaB helicase and its complex with a domain of DnaG primase. *Science (New York, N.Y.)* **318**(5849), 459–63.
- BAKER, T. A, FUNNELL, B.E. Y KORNBERG, A 1987. Helicase action of dnaB protein during replication from the *Escherichia coli* chromosomal origin in vitro. *The Journal of biological chemistry* **262**(14), 6877–85.
- BÁRCENA, M., MARTÍN, C.S., WEISE, F., AYORA, S., ALONSO, J.C. Y CARAZO, J.M. 1998. Polymorphic quaternary organization of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 replicative helicase (G40 P). *Journal of molecular biology* **283**(4), 809–19.

Bibliografia

- BÁRCENA, M., RUIZ, T., DONATE, L.E., BROWN, S.E., DIXON, N.E., RADERMACHER, M. Y CARAZO, J.M. 2001. The DnaB.DnaC complex: a structure based on dimers assembled around an occluded channel. *The EMBO journal* **20**(6), 1462–8.
- BARRY, E.R., MCGEOCH, A.T., KELMAN, Z. Y BELL, S.D. 2007. Archaeal MCM has separable processivity, substrate choice and helicase domains. *Nucleic acids research* **35**(3), 988–98.
- BELL, C.E. 2005. Structure and mechanism of Escherichia coli RecA ATPase. *Molecular microbiology* **58**(2), 358–66.
- BETZEL, C., SINGH, T.P., VISANJI, M., PETERS, K., FITTKAU, S., SAENGER, W. Y WILSON, K.S. 1993. Structure of the complex of proteinase K with a substrate analogue hexapeptide inhibitor at 2.2-Å resolution. *The Journal of biological chemistry* **268**(21), 15854–8.
- BIRD, L.E., HÅKANSSON, K., PAN, H. Y WIGLEY, D.B. 1997. Characterization and crystallization of the helicase domain of bacteriophage T7 gene 4 protein. *Nucleic acids research* **25**(13), 2620–6.
- BIRD, L.E., SUBRAMANYA, H.S. Y WIGLEY, D.B. 1998. Helicases: a unifying structural theme? *Current opinion in structural biology* **8**(1), 14–8.
- BIRD, L.E., PAN, H., SOULTANAS, P. Y WIGLEY, D.B. 2000. Mapping protein-protein interactions within a stable complex of DNA primase and DnaB helicase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry* **39**(1), 171–82.
- BISWAS, E.E. Y BISWAS, S.B. 1999a. Mechanism of DNA binding by the DnaB helicase of *Escherichia coli*: analysis of the roles of domain gamma in DNA binding. *Biochemistry* **38**(34), 10929–39.
- BISWAS, E.E. Y BISWAS, S.B. 1999b. Mechanism of DnaB helicase of *Escherichia coli*: structural domains involved in ATP hydrolysis, DNA binding, and oligomerization. *Biochemistry* **38**(34), 10919–28.
- BISWAS, S.B., CHEN, P.H. Y BISWAS, E.E. 1994. Structure and function of *Escherichia coli* DnaB protein: role of the N-terminal domain in helicase activity. *Biochemistry* **33**(37), 11307–14.
- BISWAS, T. Y TSODIKOV, O. V 2008. Hexameric ring structure of the N-terminal domain of *Mycobacterium tuberculosis* DnaB helicase. *The FEBS journal* **275**(12), 3064–71.
- BOROWSKI, P., NIEBUHR, A., SCHMITZ, H., HOSMANE, R.S., BRETNER, M., SIWECKA, M. A Y KULIKOWSKI, T. 2002. NTPase/helicase of Flaviviridae: inhibitors and inhibition of the enzyme. *Acta biochimica Polonica* **49**(3), 597–614.
- BOROWSKI, P., SCHALINSKI, S. Y SCHMITZ, H. 2002. Nucleotide triphosphatase/helicase of hepatitis C virus as a target for antiviral therapy. *Antiviral research* **55**(3), 397–412.
- BRAMHILL, D. Y KORNBERG, A. 1988. Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell* **52**(5), 743–55.
- BREWSTER, A.S. Y CHEN, X.S. 2010. Insights into the MCM functional mechanism: lessons learned from the archaeal MCM complex. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **45**(3), 243–56.
- BROSH, R.M., KAROW, J.K., WHITE, E.J., SHAW, N.D., HICKSON, I.D. Y BOHR, V. A 2000. Potent inhibition of werner and bloom helicases by DNA minor groove binding drugs. *Nucleic acids research* **28**(12), 2420–30.
- BUJALOWSKI, W. Y KLONOWSKA, M.M. 1993. Negative cooperativity in the binding of nucleotides to *Escherichia coli* replicative helicase DnaB protein. Interactions with fluorescent nucleotide analogs. *Biochemistry* **32**(22), 5888–900.

- BUJALOWSKI, W. Y JEZEWSKA, M.J. 1995. Interactions of Escherichia coli primary replicative helicase DnaB protein with single-stranded DNA. The nucleic acid does not wrap around the protein hexamer. *Biochemistry* **34**(27), 8513–9.
- BURATOWSKI, S. Y CHODOSH, L.A. 2001. Mobility shift DNA-binding assay using gel electrophoresis. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.] **Chapter 12**, Unit 12.2.
- CAPECCHI, T., DE KONING, C.B. Y MICHAEL, J.P. 2000. Synthesis of the bisbenzannelated spiroketal core of the γ -rubromycins. The use of a novel Nef-type reaction mediated by Pearlman's catalyst. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* (16), 2681–2688.
- CHEN, Z., YANG, H. Y PAVLETICH, N.P. 2008. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature* **453**(7194), 489–4.
- CHEOK, C.F., WU, L., GARCIA, P.L., JANSACK, P. Y HICKSON, I.D. 2005. The Bloom's syndrome helicase promotes the annealing of complementary single-stranded DNA. *Nucleic acids research* **33**(12), 3932–41.
- CHINO, M., NISHIKAWA, K., UMEKITA, M., HAYASHI, C., YAMAZAKI, T., TSUCHIDA, T., SAWA, T., HAMADA, M. Y TAKEUCHI, T. 1996. Heliquinomycin, a new inhibitor of DNA helicase, produced by Streptomyces sp. MJ929-SF2 I. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *The Journal of antibiotics* **49**(8), 752–7.
- CHINO, M., NISHIKAWA, K., YAMADA, A., OHSONO, M., SAWA, T., HANAOKA, F., ISHIZUKA, M. Y TAKEUCHI, T. 1998. Effect of a novel antibiotic, heliquinomycin, on DNA helicase and cell growth. *The Journal of antibiotics* **51**(5), 480–6.
- CHINTAKAYALA, K., LARSON, M. A, GRIEP, M. A, HINRICH, S.H. Y SOULTANAS, P. 2008. Conserved residues of the C-terminal p16 domain of primase are involved in modulating the activity of the bacterial primosome. *Molecular microbiology* **68**(2), 360–71.
- CHODOSH, L. A 2001. UV crosslinking of proteins to nucleic acids. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.] **Chapter 12**, Unit 12.5.
- CLARDY, J. Y WALSH, C. 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* **432**(7019), 829–37.
- CLARK, D. Y HENIKOFF, S. 1996. Ordered deletions using exonuclease III. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **57**, 139–47.
- CONSTANTINESCO, F., FORTERRE, P., KOONIN, E. V, ARAVIND, L. Y ELIE, C. 2004. A bipolar DNA helicase gene, herA, clusters with rad50, mre11 and nurA genes in thermophilic archaea. *Nucleic acids research* **32**(4), 1439–47.
- COSTA, A., PAPE, T., VAN HEEL, M., BRICK, P., PATWARDHAN, A. Y ONESTI, S. 2006. Structural basis of the Methanothermobacter thermoautotrophicus MCM helicase activity. *Nucleic acids research* **34**(20), 5829–38.
- COSTA, A., HOOD, I. V Y BERGER, J.M. 2013. Mechanisms for initiating cellular DNA replication. *Annual review of biochemistry* **82**, 25–54.
- COX, M.M. 2007. Motoring along with the bacterial RecA protein. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**(2), 127–38.
- CRAMPTON, D.J., MUKHERJEE, S. Y RICHARDSON, C.C. 2006. DNA-induced switch from independent to sequential dTTP hydrolysis in the bacteriophage T7 DNA helicase. *Molecular cell* **21**(2), 165–74.
- CRAMPTON, D.J., OHI, M., QIMRON, U., WALZ, T. Y RICHARDSON, C.C. 2006. Oligomeric states of bacteriophage T7 gene 4 primase/helicase. *Journal of molecular biology* **360**(3), 667–77.

Bibliografia

- CROZAT, E. Y GRAINGE, I. 2010. FtsK DNA translocase: the fast motor that knows where it's going. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **11**(16), 2232–43.
- DAVEY, M.J., FANG, L., MCINERNEY, P., GEORGESCU, R.E. Y O'DONNELL, M. 2002. The DnaC helicase loader is a dual ATP/ADP switch protein. *The EMBO journal* **21**(12), 3148–59.
- DONATE, L.E., LLORCA, O., BÁRCENA, M., BROWN, S.E., DIXON, N.E. Y CARAZO, J.M. 2000. pH-controlled quaternary states of hexameric DnaB helicase. *Journal of molecular biology* **303**(3), 383–93.
- DRISCOLL, R. Y CIMPRICH, K. A. 2009. HARPing on about the DNA damage response during replication. *Genes y Development* **23**(20), 2359–2365.
- DUDERSTADT, K.E., CHUANG, K. Y BERGER, J.M. 2011. DNA stretching by bacterial initiators promotes replication origin opening. *Nature* **478**(7368), 209–13.
- DUNKER, A.K., LAWSON, J.D., BROWN, C.J., WILLIAMS, R.M., ROMERO, P., OH, J.S., OLDFIELD, C.J., CAMPEN, A.M., RATLIFF, C.M., HIPPS, K.W., AUSIO, J., NISSEN, M.S., REEVES, R., KANG, C., KISSINGER, C.R., BAILEY, R.W., GRISWOLD, M.D., CHIU, W., GARNER, E.C. Y OBRADOVIC, Z. 2001. Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **19**(1), 26–59.
- ECKARDT, K., TRESSELT, D. Y IHN, W. 1978. The structure of the antibiotic griseorhodin C. *The Journal of antibiotics* **31**(10), 970–3.
- EGELMAN, E.H., YU, X., WILD, R., HINGORANI, M.M. Y PATEL, S.S. 1995. Bacteriophage T7 helicase/primase proteins form rings around single-stranded DNA that suggest a general structure for hexameric helicases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(9), 3869–73.
- ENEMARK, E.J. Y JOSHUA-TOR, L. 2006. Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature* **442**(7100), 270–5.
- ENEMARK, E.J. Y JOSHUA-TOR, L. 2008. On helicases and other motor proteins. *Current opinion in structural biology* **18**(2), 243–57.
- ERZBERGER, J.P. Y BERGER, J.M. 2006. Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **35**, 93–114.
- ERZBERGER, J.P., MOTT, M.L. Y BERGER, J.M. 2006. Structural basis for ATP-dependent DnaA assembly and replication-origin remodeling. *Nature structural y molecular biology* **13**(8), 676–83.
- EVERS, T.H., APPELHOF, M. A M., MEIJER, E.W. Y MERKX, M. 2008. His-tags as Zn(II) binding motifs in a protein-based fluorescent sensor. *Protein engineering, design y selection : PEDS* **21**(8), 529–36.
- FASS, D., BOGDEN, C.E. Y BERGER, J.M. 1999. Crystal structure of the N-terminal domain of the DnaB hexameric helicase. *Structure (London, England : 1993)* **7**(6), 691–8.
- FOUTS, E.T., YU, X., EGELMAN, E.H. Y BOTCHAN, M.R. 1999. Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase. *The Journal of biological chemistry* **274**(7), 4447–58.
- GABBAI, C.B. Y MARIANS, K.J. 2010. Recruitment to stalled replication forks of the PriA DNA helicase and replisome-loading activities is essential for survival. *DNA repair* **9**(3), 202–9.
- GAI, D., CHANG, Y.P. Y CHEN, X.S. 2010. Origin DNA melting and unwinding in DNA replication. *Current opinion in structural biology* **20**(6), 756–62.
- GALLETTO, R., JEZEWSKA, M.J. Y BUJALOWSKI, W. 2003. Interactions of the Escherichia coli DnaB Helicase Hexamer with the Replication Factor the DnaC Protein. Effect of

- Nucleotide Cofactors and the ssDNA on Protein–Protein Interactions and the Topology of the Complex. *Journal of Molecular Biology* **329**(3), 441–465.
- GARCIA, P.L., LIU, Y., JIRICNY, J., WEST, S.C. Y JANSČAK, P. 2004. Human RECQ5 β , a protein with DNA helicase and strand-annealing activities in a single polypeptide. *The EMBO journal* **23**(14), 2882–91.
- GARNER, E., ROMERO, P., DUNKER, A., BROWN, C. Y OBRADOVIC, Z. 1999. Predicting Binding Regions within Disordered Proteins. *Genome informatics. Workshop on Genome Informatics* **10**, 41–50.
- GEORGE, J.W., GHATE, S., MATSON, S.W. Y BESTERMAN, J.M. 1992. Inhibition of DNA helicase II unwinding and ATPase activities by DNA-interacting ligands. Kinetics and specificity. *The Journal of biological chemistry* **267**(15), 10683–9.
- GHOSAL, G., YUAN, J. Y CHEN, J. 2011. The HARP domain dictates the annealing helicase activity of HARP/SMARCAL1. *EMBO reports* **12**(6), 574–80.
- GIRALDO, R. 2003. Common domains in the initiators of DNA replication in Bacteria, Archaea and Eukarya: combined structural, functional and phylogenetic perspectives. *FEMS microbiology reviews* **26**(5), 533–54.
- GOLDMAN, M.E., SALITURO, G.S., BOWEN, J.A., WILLIAMSON, J.M., ZINK, D.L., SCHLEIF, W.A. Y EMINI, E.A. 1990. Inhibition of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase activity by rubromycins: competitive interaction at the template.primer site. *Molecular pharmacology* **38**(1), 20–5.
- GÓMEZ-LLORENTE, Y., FLETCHER, R.J., CHEN, X.S., CARAZO, J.M. Y SAN MARTÍN, C. 2005. Polymorphism and double hexamer structure in the archaeal minichromosome maintenance (MCM) helicase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *The Journal of biological chemistry* **280**(49), 40909–15.
- GORBALENYA, A.E. Y KOONIN, E. V. 1993. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology* **3**(3), 419–429.
- GUO, S., TABOR, S. Y RICHARDSON, C.C. 1999a. The linker region between the helicase and primase domains of the bacteriophage T7 gene 4 protein is critical for hexamer formation. *The Journal of biological chemistry* **274**(42), 30303–9.
- GUO, S., TABOR, S. Y RICHARDSON, C.C. 1999b. The linker region between the helicase and primase domains of the bacteriophage T7 gene 4 protein is critical for hexamer formation. *The Journal of biological chemistry* **274**(42), 30303–9.
- GUPTA, R. Y BROSH, R.M. 2008. Helicases as prospective targets for anti-cancer therapy. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **8**(4), 390–401.
- HAYASHI, F., SUZUKI, H., IWASE, R., UZUMAKI, T., MIYAKE, A., SHEN, J.-R., IMADA, K., FURUKAWA, Y., YONEKURA, K., NAMBA, K. Y ISHIURA, M. 2003. ATP-induced hexameric ring structure of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *Genes to cells: devoted to molecular y cellular mechanisms* **8**(3), 287–96.
- VON HIPPEL, P.H. Y DELAGOUTTE, E. 2001. A general model for nucleic acid helicases and their “coupling” within macromolecular machines. *Cell* **104**(2), 177–90.
- IOANNOU, C., SCHAEFFER, P.M., DIXON, N.E. Y SOULTANAS, P. 2006. Helicase binding to DnaI exposes a cryptic DNA-binding site during helicase loading in *Bacillus subtilis*. *Nucleic acids research* **34**(18), 5247–58.
- ISHIMI, Y., SUGIYAMA, T., NAKAYA, R., KANAMORI, M., KOHNO, T., ENOMOTO, T. Y CHINO, M. 2009. Effect of heliquinomycin on the activity of human minichromosome maintenance 4/6/7 helicase. *The FEBS journal* **276**(12), 3382–91.

- ITSATHITPHAISARN, O., WING, R. A., ELIASON, W.K., WANG, J. Y STEITZ, T. A 2012. The hexameric helicase DnaB adopts a nonplanar conformation during translocation. *Cell* **151**(2), 267–77.
- IYER, L.M., MAKAROVA, K.S., KOONIN, E. V Y ARAVIND, L. 2004. Comparative genomics of the FtsK-HerA superfamily of pumping ATPases: implications for the origins of chromosome segregation, cell division and viral capsid packaging. *Nucleic acids research* **32**(17), 5260–79.
- JAMROZE, A., PERUGINO, G., VALENTI, A., RASHID, N., ROSSI, M., AKHTAR, M. Y CIARAMELLA, M. 2013. The Reverse Gyrase from *Pyrobaculum calidifontis*, a Novel Extremely Thermophilic DNA Topoisomerase Endowed with DNA Unwinding and Annealing Activities. *Journal of Biological Chemistry* **289**(6), 3231–3243.
- JENKINSON, E.R., COSTA, A., LEECH, A.P., PATWARDHAN, A., ONESTI, S. Y CHONG, J.P.J. 2009. Mutations in subdomain B of the minichromosome maintenance (MCM) helicase affect DNA binding and modulate conformational transitions. *The Journal of biological chemistry* **284**(9), 5654–61.
- JEZEWSKA, M.J., KIM, U.S. Y BUJALOWSKI, W. 1996. Binding of Escherichia coli primary replicative helicase DnaB protein to single-stranded DNA. Long-range allosteric conformational changes within the protein hexamer. *Biochemistry* **35**(7), 2129–45.
- JEZEWSKA, M.J., RAJENDRAN, S., BUJALOWSKA, D. Y BUJALOWSKI, W. 1998. Does single-stranded DNA pass through the inner channel of the protein hexamer in the complex with the Escherichia coli DnaB Helicase? Fluorescence energy transfer studies. *The Journal of biological chemistry* **273**(17), 10515–29.
- JEZEWSKA, M.J., RAJENDRAN, S. Y BUJALOWSKI, W. 1998. Functional and structural heterogeneity of the DNA binding site of the Escherichia coli primary replicative helicase DnaB protein. *The Journal of biological chemistry* **273**(15), 9058–69.
- JOHNSON, A. Y O'DONNELL, M. 2005. Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annual review of biochemistry* **74**, 283–315.
- KAPLAN, D.L. 2000. The 3'-tail of a forked-duplex sterically determines whether one or two DNA strands pass through the central channel of a replication-fork helicase. *Journal of molecular biology* **301**(2), 285–99.
- KAPLAN, D.L. Y STEITZ, T.A. 1999. DnaB from *Thermus aquaticus* unwinds forked duplex DNA with an asymmetric tail length dependence. *The Journal of biological chemistry* **274**(11), 6889–97.
- KAPLAN, D.L. Y O'DONNELL, M. 2002. DnaB drives DNA branch migration and dislodges proteins while encircling two DNA strands. *Molecular cell* **10**(3), 647–57.
- KELCH, B. A, MAKINO, D.L., O'DONNELL, M. Y KURIYAN, J. 2012. Clamp loader ATPases and the evolution of DNA replication machinery. *BMC biology* **10**, 34.
- KIM, K.I., CHEONG, G.W., PARK, S.C., HA, J.S., WOO, K.M., CHOI, S.J. Y CHUNG, C.H. 2000. Heptameric ring structure of the heat-shock protein ClpB, a protein-activated ATPase in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **303**(5), 655–66.
- KOWALCZYKOWSKI, S.C., DIXON, D. A, EGGLESTON, A K., LAUDER, S.D. Y REHRAUER, W.M. 1994. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* **58**(3), 401–65.
- KULKARNI, R.D. Y SUMMERS, A.O. 1999. MerR cross-links to the alpha, beta, and sigma 70 subunits of RNA polymerase in the preinitiation complex at the merTPCAD promoter. *Biochemistry* **38**(11), 3362–8.

- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680–5.
- LEBOWITZ, J.H. Y McMACKEN, R. 1986. The Escherichia coli dnaB replication protein is a DNA helicase. *The Journal of biological chemistry* **261**(10), 4738–48.
- LEE, S. Y RICHARDSON, C.C. 2011. Choreography of bacteriophage T7 DNA replication. *Current opinion in chemical biology* **15**(5), 580–6.
- LEIPE, D.D., ARAVIND, L. Y KOONIN, E. V 1999. Did DNA replication evolve twice independently? *Nucleic acids research* **27**(17), 3389–401.
- LEIPE, D.D., ARAVIND, L., GRISHIN, N. V Y KOONIN, E. V 2000. The bacterial replicative helicase DnaB evolved from a RecA duplication. *Genome research* **10**(1), 5–16.
- LEONARD, A.C. Y GRIMWADE, J.E. 2011. Regulation of DnaA assembly and activity: taking directions from the genome. *Annual review of microbiology* **65**, 19–35.
- LI, Y. Y ARAKI, H. 2013. Loading and activation of DNA replicative helicases: the key step of initiation of DNA replication. *Genes to cells : devoted to molecular y cellular mechanisms* **18**(4), 266–77.
- LI, Z., LU, S., HOU, G., MA, X., SHENG, D., NI, J. Y SHEN, Y. 2008. Hjm/Hel308A DNA helicase from *Sulfolobus tokodaii* promotes replication fork regression and interacts with Hjc endonuclease in vitro. *Journal of bacteriology* **190**(8), 3006–17.
- LIU, B., ELIASON, W.K. Y STEITZ, T. A 2013. Structure of a helicase-helicase loader complex reveals insights into the mechanism of bacterial primosome assembly. *Nature communications* **4**, 2495.
- LIU, B., LIN, J. Y STEITZ, T.A. 2013. Structure of the PolIII α - τ -DNA Complex Suggests an Atomic Model of the Replisome. *Structure* **21**(4), 658–664.
- LIU, Z. Y HUANG, Y. 2014. Advantages of proteins being disordered. *Protein science : a publication of the Protein Society* **00**, 1–12.
- LO, Y.-H., TSAI, K.-L., SUN, Y.-J., CHEN, W.-T., HUANG, C.-Y. Y HSIAO, C.-D. 2009. The crystal structure of a replicative hexameric helicase DnaC and its complex with single-stranded DNA. *Nucleic acids research* **37**(3), 804–14.
- LOHMAN, T.M. Y FERRARI, M.E. 1994. Escherichia coli single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities. *Annual review of biochemistry* **63**, 527–70.
- LOHMAN, T.M. Y BJORNSEN, K.P. 1996. Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annual review of biochemistry* **65**, 169–214.
- LÖWE, J., ELLONEN, A., ALLEN, M.D., ATKINSON, C., SHERRATT, D.J. Y GRAINGE, I. 2008. Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Molecular cell* **31**(4), 498–509.
- LYUBIMOV, A.Y., STRYCHARSKA, M. Y BERGER, J.M. 2011. The nuts and bolts of ring-translocase structure and mechanism. *Current opinion in structural biology*, 1–9.
- MAKOWSKA-GRZYSKA, M. Y KAGUNI, J.M. 2010. Primase directs the release of DnaC from DnaB. *Molecular cell* **37**(1), 90–101.
- MARSZALEK, J. Y KAGUNI, J.M. 1994. DnaA protein directs the binding of DnaB protein in initiation of DNA replication in Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* **269**(7), 4883–90.
- MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, M.I., MESA, P. Y ALONSO, J.C. 2002. Bacillus subtilis tau subunit of DNA polymerase III interacts with bacteriophage SPP1 replicative DNA helicase G40P. *Nucleic acids research* **30**(23), 5056–64.

- MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, M.I., ALONSO, J.C. Y AYORA, S. 2005. Bacillus subtilis bacteriophage SPP1-encoded gene 34.1 product is a recombination-dependent DNA replication protein. *Journal of molecular biology* **351**(5), 1007–19.
- MASAI, H., TANAKA, T. Y KOHDA, D. 2010. Stalled replication forks: making ends meet for recognition and stabilization. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **32**(8), 687–97.
- MASSEY, T.H., MERCOGLIANO, C.P., YATES, J., SHERRATT, D.J. Y LÖWE, J. 2006. Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Molecular cell* **23**(4), 457–69.
- MCGEOCH, A.T., TRAKSELIS, M. A, LASKEY, R. A Y BELL, S.D. 2005. Organization of the archaeal MCM complex on DNA and implications for the helicase mechanism. *Nature structural y molecular biology* **12**(9), 756–62.
- MÉNDEZ, J. Y STILLMAN, B. 2003. Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **25**(12), 1158–67.
- MESA, P., ALONSO, J.C. Y AYORA, S. 2006. Bacillus subtilis bacteriophage SPP1 G40P helicase lacking the n-terminal domain unwinds DNA bidirectionally. *Journal of molecular biology* **357**(4), 1077–88.
- MISSICH, R., WEISE, F., CHAI, S., LURZ, R., PEDRÉ, X. Y ALONSO, J.C. 1997. The replisome organizer (G38P) of Bacillus subtilis bacteriophage SPP1 forms specialized nucleoprotein complexes with two discrete distant regions of the SPP1 genome. *Journal of molecular biology* **270**(1), 50–64.
- MIYATA, T., YAMADA, K., IWASAKI, H., SHINAGAWA, H., MORIKAWA, K. Y MAYANAGI, K. 2000. Two different oligomeric states of the RuvB branch migration motor protein as revealed by electron microscopy. *Journal of structural biology* **131**(2), 83–9.
- MIYAWAKI, A. Y TSIEN, R.Y. 2000. Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods in enzymology* **327**, 472–500.
- MIYAWAKI, A., LLOPIS, J., HEIM, R., MCCAFFERY, J.M., ADAMS, J.A., IKURA, M. Y TSIEN, R.Y. 1997. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**(6645), 882–7.
- MIZUSHINA, Y., UENO, T., ODA, M., YAMAGUCHI, T., SANEYOSHI, M. Y SAKAGUCHI, K. 2000. The biochemical mode of inhibition of DNA polymerase beta by alpha-rubromycin. *Biochimica et biophysica acta* **1523**(2-3), 172–81.
- MOTT, M.L. Y BERGER, J.M. 2007. DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nature reviews. Microbiology* **5**(5), 343–54.
- MOTT, M.L., ERZBERGER, J.P., COONS, M.M. Y BERGER, J.M. 2008. Structural synergy and molecular crosstalk between bacterial helicase loaders and replication initiators. *Cell* **135**(4), 623–34.
- NAEGELI, H., MODRICH, P. Y FRIEDBERG, E.C. 1993. The DNA helicase activities of Rad3 protein of Saccharomyces cerevisiae and helicase II of Escherichia coli are differentially inhibited by covalent and noncovalent DNA modifications. *The Journal of biological chemistry* **268**(14), 10386–92.
- NAKAYAMA, N., ARAI, N., BOND, M.W., KAZIRO, Y. Y ARAI, K. 1984a. Nucleotide sequence of dnaB and the primary structure of the dnaB protein from Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* **259**(1), 97–101.

- NAKAYAMA, N., ARAI, N., KAZIRO, Y. Y ARAI, K. 1984b. Structural and functional studies of the dnaB protein using limited proteolysis. Characterization of domains for DNA-dependent ATP hydrolysis and for protein association in the primosome. *The Journal of biological chemistry* **259**(1), 88–96.
- NIEDENZU, T., RÖLEKE, D., BAINS, G., SCHERZINGER, E. Y SAENGER, W. 2001. Crystal structure of the hexameric replicative helicase RepA of plasmid RSF1010. *Journal of molecular biology* **306**(3), 479–87.
- NITHARWAL, R.G., VERMA, V., SUBBARAO, N., DASGUPTA, S., CHOUDHURY, N.R. Y DHAR, S.K. 2012. DNA binding activity of *Helicobacter pylori* DnaB helicase: the role of the N-terminal domain in modulating DNA binding activities. *The FEBS journal* **279**(2), 234–50.
- NÚÑEZ-RAMÍREZ, R., ROBLEDO, Y., MESA, P., AYORA, S., ALONSO, J.C., CARAZO, J.M. Y DONATE, L.E. 2006. Quaternary polymorphism of replicative helicase G40P: structural mapping and domain rearrangement. *Journal of molecular biology* **357**(4), 1063–76.
- NÚÑEZ-RAMÍREZ, R., VELTEN, M., RIVAS, G., POLARD, P., CARAZO, J.M. Y DONATE, L.E. 2007. Loading a ring: structure of the *Bacillus subtilis* DnaB protein, a co-loader of the replicative helicase. *Journal of molecular biology* **367**(3), 764–9.
- OBRADOVIC, Z., PENG, K., VUCETIC, S., RADIVOJAC, P., BROWN, C.J. Y DUNKER, A K. 2003. Predicting intrinsic disorder from amino acid sequence. *Proteins* **53 Suppl 6**(February), 566–72.
- OLDFIELD, C.J. Y DUNKER, A K. 2014. Intrinsically Disordered Proteins and Intrinsically Disordered Protein Regions. *Annual review of biochemistry* (February), 1–32.
- PATEL, S.S. Y PICHA, K.M. 2000. Structure and function of hexameric helicases. *Annual review of biochemistry* **69**, 651–97.
- PATEL, S.S., PANDEY, M. Y NANDAKUMAR, D. 2011. Dynamic coupling between the motors of DNA replication: hexameric helicase, DNA polymerase, and primase. *Current opinion in chemical biology* **15**(5), 595–605.
- PEDRÉ, X., WEISE, F., CHAI, S., LÜDER, G. Y ALONSO, J.C. 1994. Analysis of cis and trans acting elements required for the initiation of DNA replication in the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *Journal of molecular biology* **236**(5), 1324–40.
- PHAM, X.H. Y TUTEJA, N. 2002. Potent inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of *pea* DNA helicase 45 by DNA-binding agents. *Biochemical and biophysical research communications* **294**(2), 334–9.
- PICHA, K.M., AHNERT, P. Y PATEL, S.S. 2000. DNA binding in the central channel of bacteriophage T7 helicase-primase is a multistep process. Nucleotide hydrolysis is not required. *Biochemistry* **39**(21), 6401–9.
- PISTON, D.W. Y KREMERS, G.-J. 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in biochemical sciences* **32**(9), 407–14.
- PRADHAN, A. Y TUTEJA, R. 2007. Bipolar, Dual *Plasmodium falciparum* helicase 45 expressed in the intraerythrocytic developmental cycle is required for parasite growth. *Journal of molecular biology* **373**(2), 268–81.
- PRADHAN, A., CHAUHAN, V.S. Y TUTEJA, R. 2005. *Plasmodium falciparum* DNA helicase 60 is a schizont stage specific, bipolar and dual helicase stimulated by PKC phosphorylation. *Molecular and biochemical parasitology* **144**(2), 133–41.
- PUGH, R. A, WU, C.G. Y SPIES, M. 2012. Regulation of translocation polarity by helicase domain 1 in SF2B helicases. *The EMBO journal* **31**(2), 503–14.

- QUAISER, A., CONSTANTINESCO, F., WHITE, M.F., FORTERRE, P. Y ELIE, C. 2008. The Mre11 protein interacts with both Rad50 and the HerA bipolar helicase and is recruited to DNA following gamma irradiation in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *BMC Molecular Biology* **9**(1), 25.
- RAJENDRAN, S., JEZEWSKA, M.J. Y BUJALOWSKI, W. 2000. Multiple-step kinetic mechanism of DNA-independent ATP binding and hydrolysis by *Escherichia coli* replicative helicase DnaB protein: quantitative analysis using the rapid quench-flow method. *Journal of molecular biology* **303**(5), 773–95.
- RANNOU, O., LE CHATELIER, E., LARSON, M. A, NOURI, H., DALMAIS, B., LAUGHTON, C., JANNIÈRE, L. Y SOULTANAS, P. 2013. Functional interplay of DnaE polymerase, DnaG primase and DnaC helicase within a ternary complex, and primase to polymerase hand-off during lagging strand DNA replication in *Bacillus subtilis*. *Nucleic acids research* **41**(10), 5303–20.
- DOS REMEDIOS, C.G. Y MOENS, P.D. 1995. Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable “ruler” for measuring structural changes in proteins. Dispelling the problem of the unknown orientation factor. *Journal of structural biology* **115**(2), 175–85.
- RUIZ-MASÓ, J. A, ANAND, S.P., ESPINOSA, M., KHAN, S. A Y DEL SOLAR, G. 2006. Genetic and biochemical characterization of the *Streptococcus pneumoniae* PcrA helicase and its role in plasmid rolling circle replication. *Journal of bacteriology* **188**(21), 7416–25.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., Y MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,p.
- SANCHEZ-BERRONDO, J., MESA, P., IBARRA, A., MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, M.I., BLANCO, L., MÉNDEZ, J., BOSKOVIC, J. Y MONTOYA, G. 2012. Molecular architecture of a multifunctional MCM complex. *Nucleic acids research* **40**(3), 1366–80.
- SANDERS, G.M., DALLMANN, H.G. Y MCHENRY, C.S. 2010. Reconstitution of the *B. subtilis* replisome with 13 proteins including two distinct replicases. *Molecular cell* **37**(2), 273–81.
- SANYAL, G. Y DOIG, P. 2012. Bacterial DNA replication enzymes as targets for antibacterial drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* **7**(4), 327–39.
- SAWAYA, M.R., GUO, S., TABOR, S., RICHARDSON, C.C. Y ELLENBERGER, T. 1999. Crystal structure of the helicase domain from the replicative helicase-primase of bacteriophage T7. *Cell* **99**(2), 167–77.
- SCHAEFFER, P.M., HEADLAM, M.J. Y DIXON, N.E. 2005. Protein--protein interactions in the eubacterial replisome. *IUBMB life* **57**(1), 5–12.
- SCHÄGGER, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* **1**(1), 16–22.
- SCHÄGGER, H. Y VON JAGOW, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**(2), 368–379.
- SCHERZINGER, E., ZIEGELIN, G., BÁRCENA, M., CARAZO, J.M., LURZ, R. Y LANKA, E. 1997. The RepA protein of plasmid RSF1010 is a replicative DNA helicase. *The Journal of biological chemistry* **272**(48), 30228–36.
- SCHLESSINGER, A., SCHAEFER, C., VICEDO, E., SCHMIDBERGER, M., PUNTA, M. Y ROST, B. 2011. Protein disorder-a breakthrough invention of evolution? *Current opinion in structural biology* **21**(3), 412–8.
- SCOTT, J.F., EISENBERG, S., BERTSCH, L.L. Y KORNBERG, A. 1977. A mechanism of duplex DNA replication revealed by enzymatic studies of phage phi X174: catalytic strand

- separation in advance of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**(1), 193–7.
- SECO, E.M., ZINDER, J.C., MANHART, C.M., LO PIANO, A., MCHENRY, C.S. Y AYORA, S. 2013. Bacteriophage SPP1 DNA replication strategies promote viral and disable host replication in vitro. *Nucleic acids research* **41**(3), 1711–21.
- SEN, D., NANDAKUMAR, D., TANG, G.-Q. Y PATEL, S.S. 2012. Human Mitochondrial DNA Helicase TWINKLE Is Both an Unwinding and Annealing Helicase. *Journal of Biological Chemistry* **287**(18), 14545–14556.
- SHARMA, S., DOHERTY, K.M. Y BROSH, R.M. 2005. DNA helicases as targets for anti-cancer drugs. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents* **5**(3), 183–99.
- SHIN, J.-H., HEO, G.-Y. Y KELMAN, Z. 2009. The Methanothermobacter thermotrophicus MCM helicase is active as a hexameric ring. *The Journal of biological chemistry* **284**(1), 540–6.
- SINGLETON, M.R., SAWAYA, M.R., ELLENBERGER, T. Y WIGLEY, D.B. 2000. Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides. *Cell* **101**(6), 589–600.
- SINGLETON, M.R., DILLINGHAM, M.S., GAUDIER, M., KOWALCZYKOWSKI, S.C. Y WIGLEY, D.B. 2004. Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks. *Nature* **432**(7014), 187–93.
- SINGLETON, M.R., DILLINGHAM, M.S. Y WIGLEY, D.B. 2007. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annual review of biochemistry* **76**, 23–50.
- SKARSTAD, K. Y KATAYAMA, T. 2013. Regulating DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**(4), a012922.
- DEL SOLAR, G., GIRALDO, R., RUIZ-ECHEVARRÍA, M.J., ESPINOSA, M. Y DÍAZ-OREJAS, R. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **62**(2), 434–64.
- SOULTANAS, P. 2002. A functional interaction between the putative primosomal protein DnaI and the main replicative DNA helicase DnaB in Bacillus. *Nucleic acids research* **30**(4), 966–74.
- SOULTANAS, P. 2012. Loading mechanisms of ring helicases at replication origins. *Molecular microbiology* **84**(1), 6–16.
- SOULTANAS, P. Y WIGLEY, D.B. 2000. DNA helicases: “inching forward”. *Current opinion in structural biology* **10**(1), 124–8.
- SOULTANAS, P., DILLINGHAM, M.S., WILEY, P., WEBB, M.R. Y WIGLEY, D.B. 2000. Uncoupling DNA translocation and helicase activity in PcrA: direct evidence for an active mechanism. *The EMBO journal* **19**(14), 3799–810.
- SPIES, M., AMITANI, I., BASKIN, R.J. Y KOWALCZYKOWSKI, S.C. 2007. RecBCD enzyme switches lead motor subunits in response to chi recognition. *Cell* **131**(4), 694–705.
- STRYCHARSKA, M.S., ARIAS-PALOMO, E., LYUBIMOV, A.Y., ERZBERGER, J.P., O’SHEA, V.L., BUSTAMANTE, C.J. Y BERGER, J.M. 2013. Nucleotide and partner-protein control of bacterial replicative helicase structure and function. *Molecular cell* **52**(6), 844–54.
- SUGIYAMA, T., CHINO, M., TSURIMOTO, T., NOZAKI, N. Y ISHIMI, Y. 2012. Interaction of heliquinomycin with single-stranded DNA inhibits MCM4/6/7 helicase. *Journal of biochemistry* **151**(2), 129–37.
- THOMSEN, N.D. Y BERGER, J.M. 2008. Structural frameworks for considering microbial protein- and nucleic acid-dependent motor ATPases. *Molecular microbiology* **69**(5), 1071–90.

- THOMSEN, N.D. Y BERGER, J.M. 2009. Running in reverse: the structural basis for translocation polarity in hexameric helicases. *Cell* **139**(3), 523–34.
- TOTH, E. A, LI, Y., SAWAYA, M.R., CHENG, Y. Y ELLENBERGER, T. 2003. The crystal structure of the bifunctional primase-helicase of bacteriophage T7. *Molecular cell* **12**(5), 1113–23.
- TRAN, N.Q., PHAM, X.H., TUTEJA, R. Y TUTEJA, N. 2011. Inhibition of unwinding and ATPase activities of pea MCM6 DNA helicase by actinomycin and nogalamycin. *Plant signaling y behavior* **6**(3), 327–9.
- TRANI, A., DALLANOCE, C., PANZONE, G., RIPAMONTI, F., GOLDSTEIN, B.P. Y CIABATTI, R. 1997. Semisynthetic derivatives of purpuromycin as potential topical agents for vaginal infections. *Journal of medicinal chemistry* **40**(6), 967–71.
- TUTEJA, N., PHAN, T.N., TUTEJA, R., OCHEM, A. Y FALASCHI, A. 1997. Inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of human DNA helicase II by chemotherapeutic agents. *Biochemical and biophysical research communications* **236**(3), 636–40.
- UENO, T., TAKAHASHI, H., ODA, M., MIZUNUMA, M., YOKOYAMA, A., GOTO, Y., MIZUSHINA, Y., SAKAGUCHI, K. Y HAYASHI, H. 2000. Inhibition of human telomerase by rubromycins: implication of spiroketal system of the compounds as an active moiety. *Biochemistry* **39**(20), 5995–6002.
- VANLOOCK, M.S., YU, X., YANG, S., LAI, A.L., LOW, C., CAMPBELL, M.J. Y EGELMAN, E.H. 2003. ATP-mediated conformational changes in the RecA filament. *Structure (London, England : 1993)* **11**(2), 187–96.
- VASHISHT, A.A., PRADHAN, A., TUTEJA, R. Y TUTEJA, N. 2005. Cold- and salinity stress-induced bipolar pea DNA helicase 47 is involved in protein synthesis and stimulated by phosphorylation with protein kinase C. *The Plant Journal* **44**(1), 76–87.
- VELTEN, M., MCGOVERN, S., MARSIN, S., EHRLICH, S.D., NOIROT, P. Y POLARD, P. 2003. A two-protein strategy for the functional loading of a cellular replicative DNA helicase. *Molecular cell* **11**(4), 1009–20.
- VUZMAN, D. Y LEVY, Y. 2012. Intrinsically disordered regions as affinity tuners in protein-DNA interactions. *Molecular bioSystems* **8**(1), 47–57.
- WANG, G., KLEIN, M.G., TOKONZABA, E., ZHANG, Y., HOLDEN, L.G. Y CHEN, X.S. 2008. The structure of a DnaB-family replicative helicase and its interactions with primase. *Nature structural y molecular biology* **15**(1), 94–100.
- WEIGEL, C. Y SEITZ, H. 2006. Bacteriophage replication modules. *FEMS microbiology reviews* **30**(3), 321–81.
- WEINSTOCK, G.M., MCENTEE, K. Y LEHMAN, I.R. 1979. ATP-dependent renaturation of DNA catalyzed by the recA protein of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**(1), 126–30.
- WEISE, F. 1997. *Biochemische Charakterisierung der Initiation der DNA-Replikation des Bacillus subtilis-Bakteriophagen SPPI*. Freie Universität Berlin, Germany,p.
- WEISS, S. 2000. Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy. *Nature structural biology* **7**(9), 724–9.
- WICKNER, S., WRIGHT, M. Y HURWITZ, J. 1974. Association of DNA-dependent and -independent ribonucleoside triphosphatase activities with dnaB gene product of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**(3), 783–7.
- WIGLEY, D.B. 2007. RecBCD: the supercar of DNA repair. *Cell* **131**(4), 651–3.

- WONG, I. Y LOHMAN, T.M. 1993. A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: application to protein-nucleic acid interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(12), 5428–32.
- WONG, I.N., SAYERS, J.R. Y SANDERS, C.M. 2013. Characterization of an unusual bipolar helicase encoded by bacteriophage T5. *Nucleic acids research* **41**(8), 4587–600.
- XI, X.G. 2007. Helicases as antiviral and anticancer drug targets. *Current medicinal chemistry* **14**(8), 883–915.
- XIE, F., WU, C.G., WEILAND, E. Y LOHMAN, T.M. 2013. Asymmetric regulation of bipolar single-stranded DNA translocation by the two motors within Escherichia coli RecBCD helicase. *The Journal of biological chemistry* **288**(2), 1055–64.
- XU, H., FRANK, J., NIEDENZU, T. Y SAENGER, W. 2000. DNA helicase RepA: cooperative ATPase activity and binding of nucleotides. *Biochemistry* **39**(40), 12225–33.
- XU, H., ZIEGELIN, G., SCHRÖDER, W., FRANK, J., AYORA, S., ALONSO, J.C., LANKA, E. Y SAENGER, W. 2001. Flavones inhibit the hexameric replicative helicase RepA. *Nucleic acids research* **29**(24), 5058–66.
- YANG, S., YU, X., VANLOOCK, M.S., JEZEWSKA, M.J., BUJALOWSKI, W. Y EGELMAN, E.H. 2002. Flexibility of the Rings: Structural Asymmetry in the DnaB Hexameric Helicase. *Journal of Molecular Biology* **321**(5), 839–849.
- YU, X. Y EGELMAN, E.H. 1997. The RecA hexamer is a structural homologue of ring helicases. *Nature structural biology* **4**(2), 101–4.
- YU, X., HINGORANI, M.M., PATEL, S.S. Y EGELMAN, E.H. 1996a. DNA is bound within the central hole to one or two of the six subunits of the T7 DNA helicase. *Nature structural biology* **3**(9), 740–3.
- YU, X., JEZEWSKA, M.J., BUJALOWSKI, W. Y EGELMAN, E.H. 1996b. The hexameric E. coli DnaB helicase can exist in different Quaternary states. *Journal of molecular biology* **259**(1), 7–14.
- YU, X., VANLOOCK, M.S., POPLAWSKI, A., KELMAN, Z., XIANG, T., TYE, B.K. Y EGELMAN, E.H. 2002. The Methanobacterium thermoautotrophicum MCM protein can form heptameric rings. *EMBO reports* **3**(8), 792–7.
- YUSUFZAI, T. Y KADONAGA, J.T. 2008. HARP is an ATP-driven annealing helicase. *Science (New York, N.Y.)* **322**(5902), 748–50.
- YUSUFZAI, T. Y KADONAGA, J.T. 2010. Annealing helicase 2 (AH2), a DNA-rewinding motor with an HNH motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(49), 20970–3.
- ZACHARIAS, D. A, VIOLIN, J.D., NEWTON, A.C. Y TSIEN, R.Y. 2002. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science (New York, N.Y.)* **296**(5569), 913–6.
- ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA, J., JAKIMOWICZ, D., ZAWILAK-PAWLIK, A. Y MESSER, W. 2007. Regulation of the initiation of chromosomal replication in bacteria. *FEMS microbiology reviews* **31**(4), 378–87.
- ZECCHI, L., LO PIANO, A., SUZUKI, Y., CAÑAS, C., TAKEYASU, K. Y AYORA, S. 2012. Characterization of the Holliday junction resolving enzyme encoded by the Bacillus subtilis bacteriophage SPP1. *PloS one* **7**(10), e48440.
- ZHANG, B., ZHANG, A., CHEN, L. Y XI, X.G. 2008a. Inhibition of DNA helicase, ATPase and DNA-binding activities of E. coli RecQ helicase by chemotherapeutic agents. *Journal of biochemistry* **143**(6), 773–9.

Bibliografía

- ZHANG, S., WEI, T., HOU, G., ZHANG, C., LIANG, P., NI, J., SHENG, D. Y SHEN, Y. 2008b. Archaeal DNA helicase HerA interacts with Mre11 homologue and unwinds blunt-ended double-stranded DNA and recombination intermediates. *DNA repair* **7**(3), 380–91.
- ZIEBARTH, T.D., GONZALEZ-SOLTERO, R., MAKOWSKA-GRZYSKA, M.M., NÚÑEZ-RAMÍREZ, R., CARAZO, J.-M. Y KAGUNI, L.S. 2010. Dynamic effects of cofactors and DNA on the oligomeric state of human mitochondrial DNA helicase. *The Journal of biological chemistry* **285**(19), 14639–47.
- ZIEGELIN, G., NIEDENZU, T., LURZ, R., SAENGER, W. Y LANKA, E. 2003. Hexameric RSF1010 helicase RepA: the structural and functional importance of single amino acid residues. *Nucleic acids research* **31**(20), 5917–29.

8. Anexo

* Artículos publicados durante la realización de la Tesis Doctoral relacionados con esta memoria:

1. S. Ayora, F. Weise, **P. Mesa**, A. Stasiak, J.C. Alonso. Bacillus subtilis bacteriophage SPP1 hexameric DNA helicase, G40P, interacts with forked DNA. Nucleic Acids Research. (2002) 30(11):2280-9.

2. S. Bailey, S.E. Sedelnikova, **P. Mesa**, S. Ayora, J.P. Waltho, A.E. Ashcroft, *et al.* Structural analysis of Bacillus subtilis SPP1 phage helicase loader protein G39P. The Journal of Biological Chemistry. (2003) 278(17):15304-12.

3. S. Bailey, S.E. Sedelnikova, **P. Mesa**, S. Ayora, J.C. Alonso, J.B. Rafferty. Crystallization of the Bacillus subtilis SPP1 bacteriophage helicase loader protein G39P. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. (2003) 59(6):1090-2.

4. **P. Mesa**, J.C. Alonso, S. Ayora. Bacillus subtilis bacteriophage SPP1 G40P helicase lacking the n-terminal domain unwinds DNA bidirectionally., Journal of Molecular Biology. (2006) 357(4):1077-88.

5. R. Núñez-Ramírez, Y. Robledo, **P. Mesa**, S. Ayora, J.C. Alonso, J.M. Carazo, *et al.* Quaternary polymorphism of replicative helicase G40P: structural mapping and domain rearrangement. Journal of Molecular Biology. (2006) 357(4):1063-76.

* Artículos publicados durante la realización de la Tesis Doctoral sobre temas distintos a los tratados en esta memoria:

- S. Ayora, R. Missich, **P. Mesa**, R. Lurz, S. Yang, E.H. Egelman, *et al.* Homologous-pairing activity of the Bacillus subtilis bacteriophage SPP1 replication protein G35P. The Journal of Biological Chemistry. (2002) 277(39):35969-79.

- M.I. Martínez-Jiménez, **P. Mesa**, J.C. Alonso. Bacillus subtilis tau subunit of DNA polymerase III interacts with bacteriophage SPP1 replicative DNA helicase G40P. Nucleic Acids Research. (2002) 30(23):5056-64.

Bibliografia